

16

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-419

⑬ Int. Cl.⁵

C 12 N 1/16
15/54
C 12 P 21/00

識別記号

ZNA K

庁内整理番号

7421-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)1月5日

C 6712-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全31頁)

⑮ 発明の名称 タンパク質のグリコシル化の調節方法

⑯ 特 願 昭63-272004

⑰ 出 願 昭63(1988)10月29日

優先権主張 ⑱1987年10月29日⑲米国(US)⑳116095

㉑ 発 明 者 ビビアン エル. マツ アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シアトル, ノース
カイ イースト ファイフティーファースト ストリート 120

㉒ 発 明 者 スーザン ケー. ウェ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94022, ロスアルトス
ルチ ヒルズ, エジャートン ロード 27750

㉓ 出 願 人 ザイモジエネティク アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シアトル, ノース
ス, インコーポレイテッド イースト, ルーズベルト ウェイ 4225

㉔ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

タンパク質のグリコシル化の調節方法

2. 特許請求の範囲

1. 糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴ
サッカライド成分の付加のために必要な生成物の
遺伝子に欠陥を有する真菌細胞であって、調節プ
ロモーター及びその下流に続く前記欠陥を補完す
るDNA配列を含んで成る第一DNA構成物、並
びに第二プロモーター及びその下流に続く分泌シ
グナルをコードするDNA配列及び異種性タンパ
ク質又はポリペプチドをコードするDNA配列を
含んで成る第二DNA構成物、により形成転換さ
れている真菌細胞。

2. 前記真菌細胞が酵母細胞である、請求項1
に記載の細胞。

3. 前記遺伝子がMNN7遺伝子、MNN8遺伝子、
MNN9遺伝子及びMNN10遺伝子から成る群から選択
されたものである、請求項2に記載の酵母細胞。

4. 前記細胞がさらにMNN1遺伝子に欠陥を有す

る、請求項3に記載の酵母細胞。

5. 前記細胞がサイレント接合型遺伝子座の発
現のために必要な遺伝子中に条件変異を含有し、
そして前記調節プロモーターが接合型調節因子を
含んで成る、請求項2に記載の酵母細胞。

6. 前記条件変異がsir3-8変異である、請求
項5に記載の方法。

7. 前記調節プロモーターがさらにTPI1プロモ
ーターを含んで成る、請求項5に記載の酵母細胞。

8. 前記第二プロモーターが調節プロモーター
である、請求項1に記載の細胞。

9. 前記第一DNA構成物及び第二DNA構成
物が単一のプラスミド中に含有されている、請求
項1に記載の細胞。

10. 前記第一DNA構成物が前記細胞のゲノム
に組み込まれている、請求項1に記載の細胞。

11. 前記第二DNA構成物が前記細胞のゲノム
に組み込まれている、請求項1に記載の細胞。

12. 前記欠陥が点変異である、請求項1に記載
の細胞。

13. 前記欠陥が遺伝子欠失である、請求項1に記載の細胞。

14. 前記タンパク質又はポリペプチドが組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、免疫グロブリン、血小板由来増殖因子、プラスミノゲン、トロンピン、ファクターXⅢ及びこれらの類似体から成る群から選択されたものである、請求項1に記載の細胞。

15. 異種性タンパク質又はポリペプチドの製造方法であって、

請求項1～14のいずれか1項に記載の真菌細胞を、糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライドの付加のために必要な生成物の遺伝子中の欠陥を補完するDNA配列が発現される第一の増殖条件下で培養し；

前記欠陥を補完するDNA配列が発現されず、そして前記異種性タンパク質又はポリペプチドをコードする前記DNA配列が発現される第二の増殖条件下で前記細胞を培養し；そして

異種性タンパク質又はポリペプチドを単離する；

サッカライドの付加のために必要な生成物の遺伝子中の欠陥を補完するDNA配列のクローニング方法であって、

前記遺伝子に欠陥を有する酵母細胞をDNA断片のライブラリーにより形質転換し；

該酵母細胞を固体培地上で培養してコロニーを形成せしめ；

該コロニーを透過性にし；

該透過性にされたコロニーに、4.0より高く且つ7.4より低いpHを有しアゾコールを含んで成る組成物を重層し；

Mnn9⁻表現型を示すコロニーの周囲に明瞭なハローが形成されるのに十分な条件下で前記コロニーをインキュベートし；

明瞭なハローを示さないコロニーを選択し；そして

選択されたコロニーから前記欠陥を補完するDNA配列を単離する；
ことを含んで成る方法。

ことを含んで成る方法。

16. 糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライドの付加のために必要な生成物の遺伝子中の欠陥を有する酵母株の同定方法であって、

活性プロテイナーゼBを有する酵母細胞を固体培地上で培養してコロニーを生成せしめ；

該コロニーを透過性にし；

該透過性にされたコロニーに、4.0より高く且つ7.4より低いpHを有しアゾコールを含んで成る組成物を重層し；

Mnn9⁻表現型を示すコロニーの周囲に明瞭なハローが形成されるのに十分な条件下で前記コロニーをインキュベートし；そして

コロニーの周囲の明瞭なハローの存在を検出し、そしてそれにより糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要な生成物の遺伝子に欠陥を有する酵母株を同定する；

ことを含んで成る方法。

17. 糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴ

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

一般的には、本発明は異種性タンパク質またはポリペプチドの産生方法に関し、より詳細には、タンパク質のグリコシル化の調節方法に関する。

(発明の背景)

組換えDNA技術の近年の進歩は、異種性ポリペプチド産生用宿主として真菌細胞の使用をもたらした。最も広範囲に利用できる真菌としては、パン酵母〔サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)〕が挙げられる。酵母細胞から培地中に異種性タンパク質を輸送する酵母分泌タンパク質が開発されてきた。輸送異種性タンパク質の精製を促進するために少量の天然酵母タンパク質が培地中に輸送されている (Hitzemanら、*Science* 219: 620~625, 1983)。酵母の分泌経路を経るタンパク質通過物には、多くの場合に生理活性の適当な維持および／または完全な生理活性を達成するために必要な変性、ジスルフィド結

合の形成および糖タンパク質のグリコシル化が施される。

酵母の分泌経路は、分泌に向けられたタンパク質のグリコシル化部位に、2つの結合様式を介するオリゴサッカライドおよびマンノース成分の転移を司る (Kukurizinskaら、Ann.Rev.Biochem., 56: 915~944, 1987)。O-結合性グリコシル化は、糖タンパク質上の Ser または Thr 残基への1個のマンノース成分の転移により開始される。ポリペプチド鎖上の Asn 残基へのコアオリゴサッカライド構造の付加は、N-結合性グリコシル結合を構築する (SheckmanおよびNovick, in Strathernら、編、Mol.Biol.of Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 361~393ページ、1982)。N-結合性コアオリゴサッカライド構造の付加のための受容体部位は、たとえば次のすべてのトリペプチドがN-結合性グリコシル化に対するホストとならないとしても、Asn-X-Ser または Asn-X-Thr (但し、Xはいか

なるアミノ酸であってもよい) のトリペプチド配列を有する。このトリペプチド配列受容体は、哺乳類糖タンパク質中で同定されたこれらの部位との一致を示す酵母糖タンパク質中に見い出された (Kukurizinskaら、Ann.Rev.Biochem., 56: 915~944, 1987、参照)。また、アスペルギルス・ニデランス (*Aspergillus nidulans*) もこれらのトリペプチド受容体配列において異種性タンパク質をグリコシル化することが判明している。

酵母は、自然界でグリコシル化されることが明らかにになっているN-結合性受容体部位において異種性糖タンパク質をグリコシル化することが判明している。例えば、ボウズ (Bowes) メラノーマ細胞から単離された組織プラスミノーゲン活性化因子は、4箇所の潜在的なN-結合性グリコシル化部位を有し、そしてこれらのうち3箇所がグリコシル化される。2箇所の潜在的なN-結合性グリコシル化部位を含有するウシのプロキモシンは、ウシの細胞と同じ部位でグリコシル化を示す酵母を用いて発現させた場合、そのうちの1箇所だけ

がグリコシル化される。前記N-結合性を有する酵母糖タンパク質のコアオリゴサッカライド構造は、哺乳類の糖タンパク質における類似のオリゴサッカライド構造と同一であることを示す (Ballou, in Strathernら、編、Mol.Biol.of Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 335~360ページ、1982)。

アウターチェーン (outer chain) グリコシル化は、しばしば構造中の種特異性を示し、この構造がタンパク質の生理活性の重要な役割を演ずる。例えば、酵母産生糖タンパク質上のN-結合性コアオリゴサッカライド構造に結合した外側鎖オリゴサッカライドは、構造中で分岐し、哺乳類産生糖タンパク質に存在するアウターチェーンオリゴサッカライドとよく一致する。酵母では、モノー、ジーおよびトリアンノシル分枝が結合するところにマンノース残基が α , 1 \rightarrow 6結合した骨核から成るアウターチェーンオリゴサッカライドは、N-結合性オリゴサッカライドコア構造に連結する。

酵母は、このようにして異種性タンパク質をグリコシル化する可能性があり、原物質の外側のオリゴサッカライド鎖から著しく相違し得るそれらの存在をもたらしている。アウターチェーンオリゴサッカライド組成のこの相違は、これらのタンパク質の高次構造または活性が酵母グリコシル化により妨害されるため生理活性の減少または欠失をもたらすであろう。

異種性オリゴサッカライド構造の存在は、療法剤として組換え糖タンパク質の使用を考慮する場合に、疑問を提起する可能性がある。例えば、酵母細胞の全体をラビットまたはヤギに注射した場合には細胞壁オリゴサッカライド鎖が主として免疫原になることが示されている (Ballou, J.Biol.Chem., 245: 1197, 1970、およびSuzukiら、Jpn.J.Microbiol., 12: 19, 1968)。細胞壁に存在するオリゴサッカライドは、インペルターゼのような分泌糖タンパク質に存在するオリゴサッカライドと同一であることが明らかにされている (前述の、SheckmanおよびNovickらの文献を参照)。

酵母で発現されている異種性糖タンパク質としては、免疫グロブリン、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)、エプスタイン・バー (Epstein-Barr) ウイルスの主要な外皮タンパク (gp350) (Schultzら、Gene 54: 113~123, 1987)、および $\alpha^2\beta$ ハプトグロビン (Van der Stratenら、DNA 5: 126~136, 1986) が挙げられる。これらの糖タンパク質をコードするcDNA遺伝子で形質転換された酵母細胞の研究は、タンパク質生産物が糖側鎖に関しては異種性であることを示した。殆どの場合に、異種性生成物はタンパク質の高次グリコシル化生成物の混合物から成る。この異種性および高次グリコシル化は、前記生成物の療法上の使用を不適合にするであろう。さらに、酵母産生糖タンパク質の前記異種性は、分泌細胞培養物からそれらを精製するための追加の工程を増やす。

酵母で発現される糖タンパク質から糖残基を減少するかまたは除去する試みにの中で使用される数種の方法が公表されている。これらの方法に

は、グリコシル化阻害剤の使用、生産後の脱グリコシル化およびクローン化DNA配列の生体外変異が包含される。これらの方法がいくらか有用であることを示すとしても、それらは、ほんの限定された成功をもたらすにすぎない。

グリコシル化阻害剤ツニカマイシンの使用は、酵母産生タンパク質上へのサッカライドの付加を阻害し得る。しかし、こうして得られるタンパク質は、活性を示さずそして細胞から輸送されない可能性がある。さらに、酵母細胞のツニカマイシン処理は、タンパク質のN-結合性グリコシル化を十分には阻害せず、非常に厳密に制御された条件下で実施せねばならず、かつ長期のインキュベーションに使用することができない。従って、ツニカマイシン処理細胞に由来するタンパク質生成物は、グリコシル化されたタンパク質とグリコシル化されていないタンパク質の混合物を含み、調製物からツニカマイシンを除去するための追加の工程が必要であろう。

TorrentinoおよびMaley により公表されるよう

なエンド- β -N-アセチルグルコサミニナーゼH (エンドH) を用いるポリペプチドの生体外酵素脱グリコシル化 (J. Biol. Chem. 249: 811~817, 1974) が、ソマトスタチン (Greenら、J. Biol. Chem. 261: 7558~7565, 1986)、 α -1-アンチトリプシン (Van der Stratenら、同誌)、および $\alpha^2\beta$ ハプトグロビン (Van der Stratenら、同誌) のような酵母産生タンパク質の脱グリコシル化に使用されている。酵母産生tPAの変性しない条件下でのエンドH処理は、糖のすべてを除去するためには役に立たず、その結果タンパク質生成物はもとの異種性が残存するため、療法上の使用には適さない。生体外脱グリコシル化のこの方法は、タンパク質生成物の加工およびそのタンパク質の市販の製品から酵素を完全に除去するに要する追加の工程が増加する欠点を有する。これらの余分な工程は、製品原価を高め、そして必ずしもそのタンパク質からすべてのオリゴサッカライド側鎖の除去をもたらさないであろう。

酵母産生糖タンパク質に関連する前記問題点解

決に対する他の試みとしては、変異を用いるグリコシル化部位の除去が挙げられる。潜在的なグリコシル化部位の1つまたは全部を改変し、N-結合性グリコシル化を防いだヒト組織プラスミノゲン活性化因子の変異が公表されている (Haigwoodら、EP 227,462, 1987、および Heyhackら、EP 225,286, 1987)。前記文献で Heyhackらは、酵母産生の低グリコシル化tPAが生理活性を維持することを報告している。しかしながら、かかるタンパク質は、安定でないようであり、そのため市販用の製品としては適さない。さらに、これらの変異は、各潜在性グリコシル化部位での生体外変異誘発により生じ、そして酵母から分泌される異種糖タンパク質をコードする各遺伝子またはcDNA上で前記変異誘発を繰り返さねばならない。このような変異は、アミノ酸配列の変化を起こし、天然に存在せず、かつ、安定性、半減期または溶解性に変化した変性タンパク質をもたらす。

(発明が解決しようとする課題)

従って、当該技術分野では、減少したグリコシル化を伴う酵母に由来する生理活性タンパク質の産生方法を改良する必要性が存在する。そこで、本発明は、酵母分泌タンパク質生成物に広範囲に適用し得る前述の方法を提供することを目的とする。また、本発明の方法は、均一なタンパク質生成物の精製のための少ない工程の有利な方法をも提供し、この方法は、目的のタンパク質の製造原価の低減をもたらす。

(課題を解決するための手段)

前述したように、本発明は、異種性タンパク質またはポリペプチドの産生方法を開示する。一般に、かかる方法の一つは、

(a) 糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる生成物の遺伝子に欠陥を有する真菌細胞に、調節プロモーター及びその下流に続く前記欠陥を補完するDNA配列を含んでなる第一のDNA構成物

ン活性化因子、ウロキナーゼ、免疫グロブリン、血小板由来成長因子、プラスミノーゲン、トロンビン、ファクターXIII、およびそれらの類似物が挙げられる。

本発明の他の態様は、糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライドの付加のために必要とされる生成物の遺伝子に欠陥を有する真菌細胞であって、該細胞に、調節プロモーター及びその下流に続く前記欠陥を補完するDNA配列を含んでなる第一のDNA構成物、ならびに第二のプロモーター及びその下流に続く分泌シグナルをコードするDNA配列および異種性タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA配列を含んでなる第二のDNA構成物により形質転換された前記細胞を開示する。

本発明に関連する態様としては、表現型Mnn9⁻を有し、かつ浸透圧の安定の不存在下で正常な形態のコロニーを生じ得る酵母細胞を開示する。好ましい態様では、この酵母細胞は、*pep4*変異、またはさらに*MNN1*遺伝子の欠陥を有する。

を導入すること、

(b) 第二のプロモーター及びその下流に続く分泌シグナルをコードするDNA配列および異種性タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA配列を含んでなる第二のDNA構成物を導入すること、

(c) 前記欠陥を補完するDNA配列が発現するような第一の増殖条件下で前記真菌細胞を培養すること、

(d) 前記欠陥を補完するDNA配列が発現せず、且つ前記異種性タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA配列が発現するような第二の増殖条件下で前記真菌細胞を培養すること、ならびに

(e) 前記異種性タンパク質またはポリペプチドを単離することを含んでなる。好ましい真菌細胞としては、アスペルギルス (*Aspergillus*) および酵母が挙げられる。

本発明の方法を利用して産生することができる各種のタンパク質としては、組織プラスミノーゲ

本発明の好ましい態様では、一般に、

(a) 表現型Mnn9⁻を有し、かつ浸透圧の安定の不存在下で正常な形態のコロニーを生じ得る酵母細胞に、プロモーター、分泌シグナルをコードするDNA配列および異種性タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA配列を導入すること、

(b) 前記タンパク質またはポリペプチドをコードする前記DNA配列が発現するような条件下で前記細胞を培養すること、ならびに

(c) 前記異種性タンパク質またはポリペプチドを単離することを含んでなる。特に好ましい態様では、前記細胞が酵母ZY300株に由来する。前記プロモーターは、構成的プロモーターであるか、または調節プロモーターであることができる。

本発明のさらに他の態様は、糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる生成物の遺伝子に欠陥を有する酵母株の同定方法を開示する。一般に、この方法は、

(a) 固体培地上でプロテイナーゼB活性を有する酵母細胞を培養してコロニーを形成すること、

(b) このコロニーを透過性にする事、

(c) この透過性にされたコロニーを、アゾコール(azocoll)を含んでなる組成物であって、4.0より高く、且つ7.4より低いpHを有する該組成物で重層すること、

(d) 表現型Mnn9⁻を示すコロニーの周囲に明瞭なハローを形成するのに十分な条件下で前記コロニーをインキュベーションすること、ならびに

(e) 前記コロニーの周囲の明瞭なハローの有無を測定し、それらから糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる生成物の遺伝子に欠陥を示す酵母株を同定することを含んでなる。

本発明の他の態様では、糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる生成物の遺伝子の欠陥を補完するDNA配列のクローニング方法を開示する。一般的にこの方法は、

(a) 前記遺伝子の欠陥を有する酵母細胞のDNA断片ライブラリーで形質転換すること、

(b) 固体培地上で前記酵母細胞を培養し、コロニーを形成すること、

(c) コロニーを透過性にする事、

(d) この透過性にされたコロニーを、アゾコールを含んでなる組成物であって、4.0より高く、且つ7.4より低いpHの該組成物を重層すること、

(e) 表現型Mnn9⁻を示すコロニーの周囲に明瞭なハローを形成するのに十分な条件下で前記コロニーをインキュベーションすること、

(f) 明瞭なハローを示さないコロニーを選択すること、ならびに

(g) 選択されたコロニーから前記欠陥を補完するDNA配列を単離することを含んでなる。

本発明のこれらの態様およびその他の態様は、次の詳細な説明および添付の図面により明らかとなるであろう。

(実明実施の最良の形態)

本発明を説明する前に、本明細書で使用される特定の語の定義を示し、それらの理解を助ける。

DNA構成物とは、ヒトの介入を通して変性された一本鎖かもしくは二本鎖のいずれかのDNA分子またはかかる分子のクローンであり、全体として天然に存在しない状態で組み合わせられそして並列されたDNAセグメントを包含するものをいう。

接合(mating type) 調節要素とは、酵母MAT遺伝子生成物がそれに結合しその配列に結合する遺伝子の発現の抑制をもたらすDNA配列をいい、「オペレーター」および「オペレーター配列」の語もまた前記の要素の記述に使用される。

Mnn9⁻ 表現型とは、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で別個の均一なものとして移動する輸送または分泌される糖タンパク質の産生により特徴付けられる酵母細胞の表現型である。これらの糖タンパク質は野生型の酵母細胞により産生される糖タンパク質特徴的な高グリコシル化を欠いてい

る。

変性コアオリゴサッカライドとは、9〜13個のマノース残基に連結した2個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を含む糖タンパク質のN-結合性糖側鎖をいう。代表的な変性コアオリゴサッカライドの構造は、第1A図および第1B図として図示される。

調節プロモーターとは、外的刺激に応答して変化するレベルで、連結されたDNA配列の転写を指令するDNA配列をいう。調節プロモーターは、ある場合には中間的なレベルが得られるかも知れないが、一般的に、「オン(on)」（最大の転写レベル）となるか、または「オフ(off)」（転写が少ないかもしくは存在しない）となり、細胞の環境により異なるものである。

分泌シグナルとは、分泌ペプチドをコードするDNA配列をいう。なお、分泌ペプチドとは、細胞からの成熟ポリペプチドまたはタンパク質の分泌を司る作用を有する疎水性アミノ酸のコアにより特徴付けられるアミノ酸配列をいう。典型的

には、分泌ペプチドは、新たに合成されたタンパク質のN-末端に見い出され、分泌過程で成熟タンパク質から開裂される。

前述のごとく、本発明は、異種性糖タンパク質を変化したコアグリコシル化を伴って真菌細胞から分泌させることができる方法を開示する。具体的には、本明細書に記載される前記方法は、糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる生成物の遺伝子に欠陥を有する宿主細胞の使用により、変性コアオリゴサッカライド成分を含有する糖タンパク質の産生を可能とする点で有利である。これらの方法は、糖タンパク質の産生後の変性のためのかかり高価な方法に依存することなく実施できるだけでなく、細胞または細胞生成物にグリコシル化阻害剤を添加することなく前記方法が実施できる。

本発明の宿主細胞として使用し得る真菌細胞としては、酵母菌株（例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) spp.、シゾサッカロミセス・ボムベ (*Schizosaccharomyces pombe*)）、または

糸状真菌（例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) spp.、ニュロスボラ (*Neurospora*) spp.）が挙げられる。例えば、酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は、酵母細胞が分泌を司るタンパク質のオリゴサッカライドコア構造に、アウターチェーンオリゴサッカライドを付加することを可能にする遺伝子 (*MNN7-MNN10*) を担う。これらの遺伝子 (*mnn7-mnn10*) の欠陥を有する変異株は、糖タンパク質にアウター・マンノース成分を付加せず、均一量のグリコシル化を有する糖タンパク質をもたらす。

アウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加のために必要とされる遺伝子は、種々の方法で同定することができる。例えば、一の方法は、Ballouらによって公表されている (*J. Biol. Chem.* 255: 5986~5991, 1980)。この方法では、酵母細胞表面上に存在するマンノース成分に対する、好ましくは酵母 *mnn2* 変異細胞表面上に存在するそれらのマンノース成分に対する抗体が産生される。酵母細胞、好ましくは一倍体 *mnn2* 細胞は、変異誘

発される。次に、抗体、好ましくは標識された抗体を使用し、変異誘発された細胞の中から抗体と結合しない集団を同定する。次いで、これらの変異細胞を相互に交雑させ遺伝的に補完された群を樹立する。2種の変異細胞間の補完は、変異誘発される前の親の表現型を有する二倍体をもたらす。前記変異誘発される前の親の表現型についてスクリーニングするための好ましい方法は、親株のマンノース成分に対して向けられる抗体を使用することである。この方法により、4つの補完群 (*mnn7-mnn10* と称する) が樹立される。グリコシル化変異株の他の真菌は、変異株同定のこの方法を用いて分離することができる。

別法としては、3個以上のマンノース残基を含有するオリゴサッカライドに対して高い特異性を有するレクチン、コンカナバリンAの特性を利用する方法が挙げられる。変異誘発された細胞をコンカナバリンAのカラム上に通過させる。マンノース残基が3個より少ない細胞表面糖タンパク質を示す細胞は、かかるカラムから溶出され、この

溶出物から単離することができる。同様に、第三の方法は、マンノース残基が3個より多い細胞表面糖タンパク質を示す細胞に結合でき、マンノース残基が3個以下の糖タンパク質を示すグリコシル化変異株とは結合しない標識化コンカナバリンAを用いてグリコシル化変異株を同定することから成る。

グリコシル化変異株を分離する第四の方法としては、宿主細胞に、分泌シグナルをコードする配列及びこれに続く糖タンパク質をコードするcDNA又は異種性遺伝子を含んで成るDNA構成物を導入するものが挙げられる。この形質転換宿主株を変異誘発し、こうして変異誘発された集団は、減少したグリコシル化を伴う異種タンパク質の生成物を分泌する。

mnn9 変異株をスクリーニングする好ましい方法としては、プロテイナーゼBをアッセイした場合に *mnn9* 細胞の予期できない応答を用いるものが挙げられる。詳細には、PrB⁺である細胞（プロテイナーゼB活性を有する細胞）を、窒素源、無機

塩、ビタミン、炭素源、および浸透圧安定剤を含んでなる固体複合培地（化学的に定義されていない）で増殖させるか、または浸透圧安定剤を供給した固体合成培地の選択条件下で増殖せしめる。これらの固体培地は、寒天、アガロース、ゼラチンまたは類似物を含む。特に好ましい複合培地としては、YEPDS（2%の酵母エキス、1%のペプトン、2%のグルコース、1Mのソルビトール）が挙げられる。複合培地上で増殖したコロニーを、スフェロプラスチ化によるか、または徹底的な細胞溶解を起さないように膜に作用する溶媒の蒸気にさらすことにより透過性にする。適当な溶媒としては、トルエン、クロロホルムまたは当該技術分野で一般的に知られている他の類似の溶媒が挙げられる。合成培地上で増殖したコロニーは、そのまままたはフィルター、例えばニトロセルロース・フィルターもしくは濾紙に移し（合成培地の低いpHを捕うため）、次いでそのフィルターを酵素剤にさらすかまたは好ましくは液体窒素に浸すことにより細胞溶解する。濾紙上で増殖したま

まか、または濾紙に移されたコロニーを、溶媒蒸気にさらすことにより透過性にすることができる。次に、このフィルターを固体富培地上に置く。その後、アゾコール(azocoli)を、好ましくは上層寒天(top agar) 1 ml当たり約10 mg含んでなり、そしてpH 4.0～7.4、好ましくは約pH 7.0を有する上層寒天により前記透過性コロニーを重層する。このプレートを、20℃～40℃、好ましくは37℃の温度で、3時間～24時間、好ましくは5～8時間の範囲内でインキュベーションする。表現型Mnn9⁻を示すコロニーは、その周囲に明瞭なハローを形成する。

次に、mnn7-mnn9変異株を使用して、対応する遺伝子をクローニングする。例として、遺伝子MNN9が、酵母DNA断片のプールから、より具体的には、ゲノム酵母DNA断片のプールからクローニングされた。本発明の範囲内には、例えば、Nasmyth および Reedにより公表されている方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2119～2123, 1980)によって調製される酵母/E・コリー(E. coli)

ベクターにクローン化されているDNA断片のライブラリーも入る。詳細には、ゲノム酵母DNAを調製し、次いで適当な制限酵素で消化して、約5 kb～約20 kbを有する断片を生じさせる。好ましい酵素としては、Sau3Aのような“4塩基切断”するものが挙げられる。次に、適当な制限酵素で消化して線状にされた適当な酵母/E・コリーシャトルベクターに前記で得た断片を連結する。線状にしたベクターは再環化を避けるために脱リン酸化することが好ましい。適当なベクターとしては、YEp13(Broachら、Gene 8: 121～133, 1978)、YRp7(Stinchcombら、Nature 275: 39～45, 1978)、pJDB219 およびpJDB248 (Beggs, Nature 275: 104～108, 1978)、YCp50 (KuoおよびCampbell, Mol. Cell. Biol. 3: 1730～1737, 1983) ならびにそれらの誘導体が挙げられる。かかるベクターは、一般に、選択マーカーを含んでいる。選択マーカーとは、選択する方法が存在する何等かの優性マーカーが含まれるであろう。かかる選択マーカーとしては、栄養要求性マーカー、例えば、

LEU2（このものは、leu2変異を担う宿主株での選択を可能にする）、または抗生物質耐性をコードする遺伝子、例えば、クロラムフェニコールトランスアシラーゼ(CAT)（このものは、クロラムフェニコールの存在下で細胞の増殖を可能にする）を挙げることができる。他方、これらは、選択マーカーとして「必須遺伝子」(KawasakiおよびBell, EP 171,142)、例えばスキゾサッカロミセス・ボムベ(Schizosaccharomyces pombe)の遺伝子POT1（このものは、宿主細胞のlpi1変異を補完し、グルコースの存在下での細胞の増殖を可能にする）を含んでいてもよい。前記連結混合物でE・コリー株、例えば、RR1 (Boliverら、Gene 2: 95～113, 1977)を形質転換し、酵母DNA断片のライブラリーを増幅することが好ましい。酵母の形質転換体の選択を促進するために、前記E・コリー形質転換体ライブラリーからプラスミドDNAを調製し、次いで、遺伝子型がmnn9でありかつ酵母/E・コリーシャトルベクター上に存在する適当なマーカーにより補完される欠陥遺伝子を含

んでいるであろう酵母細胞に導入する。形質転換体コロニーは、宿主細胞中のプラスミドの存在についての適当な選択方法により選択される。次に、これらの形質転換体を、mnn9欠陥の補完についてスクリーニングする。スクリーニング方法としては、野生型の酵母細胞のマノース残基に対して向けられる抗体の使用、および変異株の糖量の測定が挙げられる。好ましいのは、前述のプロテイナーゼBアッセイを利用してmnn9変異の補完についてスクリーニングする方法である。クローン化した遺伝子MNN9を含有するコロニーは、明瞭なハローの不存在により同定される。

MNN9遺伝子のクローンは、プラスミドの脱落試験により、復帰変異によるのではなくプラスミド担持性(plasmid borne)であることが確認される。プラスミドの脱落は、非選択的な条件下で酵母細胞を増殖せしめ、プラスミドの脱落に伴い表現型 Mnn⁺ が失われるか否かを決定することにより達成される。前記陽性のクローンからDNAを、当該技術分野で既知の方法(例えば、Hartigら、

Mol. Cell. Biol. 6:1206~1224, 1986)を用いて調製する。制限部位のマッピングは、mnn9の欠陥を補完するために必要なゲノム挿入部の最小の断片を決定することにより実施できる。また、このDNA配列は、前記クローン化された遺伝子についても決定することができる。

MNN7、MNN8およびMNN 10をコードするcDNAの遺伝子は、宿主細胞において、それぞれMNN7、MNN8またはMNN 10における遺伝的欠陥を補完するために前述のような酵母DNA断片ライブラリーを用いてクローン化することができる。しながら、MNN9遺伝子のクローンの同定に用いられる好ましいスクリーニング方法は、MNN7、MNN8またはMNN10遺伝子のクローンを同定するために、同じように適当であるとは限らない。この場合の好ましいスクリーニング方法としては、野生型のオリゴサッカライド成分に対して向けられた抗体の使用およびオリゴサッカライド含有量の測定(Ballouの公表した前述の文献、1970および同、1980)が挙げられる。陽性のクローンは、MNN9遺伝子クローン

について記載したようにさらに特徴付けることができる。

本発明に従えば、アウターチェイングリコシル化を調節プロモーターの使用を介して制御し、クローン化されたMNN7、MNN8、MNN9またはMNN 10遺伝子の発現を誘導することができる。mnn7-mnn10表現型を示す細胞は、浸透圧支持の非存在下で増殖が遅くなり、細胞溶解に対して異常に敏感になる。活発な細胞増殖の間のこれらの遺伝子の調節された発現が、糖タンパク質および細胞壁成分の野生型グリコシル化を伴い、野生型と同様に前記細胞が増殖することを可能にするであろう。次に、調節プロモーターは、単にコアグリコシル化のみを伴う異種性蛋白質またはポリペプチドの産生可能にするようにターンオフされる。前記クローン化されたMNN遺伝子に融合した調節プロモーターを含んでなる発現単位は、プラスミド担持性であることができ、この場合には、該発現単位は宿主菌株のmnn変異を補完し得るであろう。また別の場合には、前記発現単位は宿主のゲノムに

組込まれていてもよい。

酵母における異種および同種DNA配列の両方の発現を誘導する調節プロモーターの使用は、当該技術分野でよく知られている。かかる配列の調節は、多数ある調節プロモーターのいずれかの一つを使用して行われている。

本発明の使用に好ましい調節プロモーターとしては、ADH2プロモーター(Youngら、in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaenderら、編、New York: Plenum, 335ページ、1982)、およびADH2-R^cプロモーター(Russellら、Nature 304: 652~654, 1983)が挙げられる。

特に好ましいプロモーターとしては、MF α 1プロモーター(KurjanおよびHerskowitz, Cell 30: 933~943, 1982)が挙げられる。また別の特に好ましいプロモーターとしては、SXRプロモーター(米国特許出願番号第889,100号明細書に記載されている。なお、該明細書の内容はここで引用することにより本明細書の内容となる)が挙げられ、このものは1又は複数の接合型(mating type)

調節要素と構成的プロモーター（例えば、1PI1プロモーター）を組み合わせている。

接合型(mating type)調節要素は、接合型に特有の態様で発現される酵母遺伝子の上流領域から単離することができ、または新たに構築することができ、一般に約20塩基対(b.p.)～約32b.p.の長さを有する。この型のプロモーターは、サイレント接合型遺伝子座の発現のために必要な遺伝子の条件変異(conditional mutation)を含む酵母株で使用される。「条件変異」の語は、ある環境条件下で前記活性遺伝子生成物の減少または欠失をもたらす、相違する環境条件下でその活性遺伝子生成物の正常(野生型)の濃度をもたらす遺伝子の変異を意味するものと理解される。最も普通の条件変異は、温度感受性変異である。温度感受性変異は、sir1、sir2、sir3およびsir4変異を含む、サイレント接合型遺伝子座の発現のために必要な遺伝子中に存在する。温度感受性変異sir3-8が特に好ましい。

前記sir3-8変異 (ste8としても知られている、

Hartwell, *J. Cell. Biol.*, **85**: 811, 1980)は、

25℃ではHMLおよびHMR遺伝子座における情報の発現を遮断するが、一方、35℃ではこれらの遺伝子座の発現が遮断されず、そのためHMLおよびHMR遺伝子座における情報が発現されるような温度感受性変異である。SXRプロモーターで使用される接合型調節要素は、STE2遺伝子に由来する。プロモーター中に置かれる要素は、活性SIR3遺伝子生成物の有無に依存して注目の遺伝子の発現を調節するであろう。

本発明で使用される酵母宿主株は、MNN7、MNN8、MNN9またはMNN10遺伝子の中に遺伝的欠陥(genetic defect)を含み、アウターチェーンオリゴサッカライド成分の付加について細胞の無力化をもたらす。例えば、この欠陥は、Ballouら(前述、1980)に記載されるようなmnn9変異、または好ましくは遺伝子の断裂(disruption)、例えばMNN9遺伝子の断裂(disruption)であり得る。遺伝子の断裂は、遺伝子をコードしている配列が中断される自然現象であるかまたは生体外遺伝子操作で生じ、

不活性な遺伝子生成物の産生をもたらすか、または全く遺伝子生成物の産生をもたらさない。この中断は、あるDNA配列の遺伝子をコードしている配列への挿入および/またはそのコード配列の幾らかもしくは全ての欠失の形をとり、タンパク質の産生を全くもたらさないか、又は完結前の翻訳の終止をもたらす。DNA配列の挿入および元来のMNNコード配列の欠失を含む遺伝子の断裂は、mnn点変異に見られるような野生型への復帰をしないであろう。

遺伝子の断裂は、Rothsteinが公表するように必ず生ずる可能性がある(in *Methods in Enzymology*, Wuら、編、**101**: 202～211)。例えば、好ましくはクローン化MNN9遺伝子のコード配列並びに5'及び3'の両方のフランキング配列を含んで成る遺伝子MNN9を含有するゲノム中の領域と相同性を示すDNA配列を含んで成るプラスミドが構築される。遺伝子MNN9をコードしている配列は、好ましくは選択マーカーの挿入により断裂される。この選択マーカーは、前記遺伝子をコードしてい

る配列を中断するか、または該遺伝子をコードしている配列の一部もしくは全部と置換してもよい。選択マーカーは、そのための表現型アッセイが存在する優性表現型を示すことによって欠失変異株の選択を可能とする幾つかの遺伝子の1つであってもよい。好ましい選択マーカーは、宿主細胞の栄養要求性を補完するか、抗生物質耐性を提供するか、または細胞が特定の炭素源を利用することを可能にするものであって、例えばURA3(Botsteinら、*Gene* **8**: 17, 1978)、LEU2(Broachら、前掲)およびHIS3(Struhlら、前掲)が挙げられる。このうち、URA3マーカーが特に好ましい。他の好ましい選択マーカーとしては、CAT遺伝子(酵母細胞にクロラムフェニコール耐性を付与する)、またはlacZ遺伝子(β-ガラクトシダーゼ活性の発現により青色のコロニーをもたらす)が挙げられる。好ましくは前記ベクター断片から単離される中断されたMNN遺伝子が含んでなる線状DNA断片を、文献(例えば、Beggs、前掲)でよく知られている方法を用いて宿主細胞中に導入する。

酵母宿主細胞は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection, Rockville, Md.) またはイースト・ジェネティック・ストック・センター(Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, Calif.) から一般に入手し得る数多くの宿主細胞のいずれかの一つであることができる。宿主細胞は、MNNコード配列を断裂するために使用された選択マーカーにより補完される遺伝子的欠陥を担持することができる。好ましい酵母株としては、SEY2101(MA7a ade2-101 leu2-3, 112 ura2-52 suc2-Δ9 gal2) またはZY100(MA7a ade2-101 leu2-3, 112 ura3-52 suc2-Δ9 gal2 Δpep4::CAT) が挙げられる。選択マーカーを含んでなる直鎖断片の組込みは、優性マーカーを用いる選別またはスクリーニングにより検出され、そしてサザン分析(Southern, J. Mol. Biol. 98: 503~517, 1975) および表現型試験により確認される。

宿主細胞としては、MNN1遺伝子ならびにMNN7、MNN8、MNN9またはMNN 10遺伝子に欠陥を有するも

のが好ましい。MNN1遺伝子の欠陥では、細胞のN-結合糖タンパク質のすべてにおいて末端α1→3結合したマンノースが除去されている(Ballouの前記総説、1982、を参照)。この宿主細胞は、例えばmnn9変異との組み合わせにより、9または10個のマンノース成分を有する変性コアオリゴサッカライド構造を含有する糖タンパク質を宿主細胞が産生すること可能にする。mnn1変異をmnn9株に、好ましくはmnn9遺伝子断裂を担持する株に導入することができ、これはこの株を所望の株とクロスすることにより、あるいは好ましくはmnn9断裂を担持する株中のMNN1遺伝子を破壊することにより行うことができる。MNN1遺伝子を断裂するには、まず最初にその遺伝子をクローン化しなければならない。MNN1遺伝子は、適当な酵母シャトルベクター中の酵母DNA断片ライブラリーを用いて、前述のようにクローン化することができる。これには、最初に前記ライブラリーでE・コリ宿主、好ましくはRR1株を形質転換することにより該ライブラリーを増幅することが好ましい。形

質転換されたE・コリからDNAを調製し、そしてこれを用いて、mnn1でありかつ前記酵母/E・コリーシャトルベクター上に存在する選択マーカーにより補完される遺伝的欠陥を有していてもよい酵母宿主を形質転換する。MNN1遺伝子クローンの同定を容易にするためには、まず最初に宿主細胞中に前記プラスミドが存在する形質転換体を選ぶ。次に、この形質転換体をmnn1欠陥の補完についてスクリーニングする。mnn1の補完のスクリーニング方法としては、野生型オリゴサッカライド成分かまたはmnn1細胞上に存在するオリゴサッカライド成分のいずれかに対する抗体を使用して、宿主細胞にMnn1+表現型を付与するDNA配列を有する形質転換体を同定することを含む(Ballou、前述、1970、およびBallou、前述、1982)。MNN1相補性の形質転換体をスクリーニングするために好ましい方法としては、陽性クローンを確認するために野生型細胞の末端α1→3結合したマンノース単位に対して向けられる抗体を使用する方法が挙げられる。MNN1遺伝子のクローンは、前述し

たように表現型Mnn1+の脱落を伴うプラスミドの脱落について試験することにより、プラスミド担持であること確認することができる。制限部位のマッピングは、mnn1の欠陥を補完するために必要なゲノム挿入部の最小の断片を決定して行うことができる。このDNA配列はまた、クローン化した遺伝子について決定することができる。

好ましい態様においては、MNN7、MNN8、MNN9もしくはMNN 10に遺伝子上の欠陥を有する酵母宿主細胞はまた、サイレント接合型遺伝子座の発現のために必要な遺伝子中にも条件変異を含む。これらの遺伝子の変異は、前述したように接合型調節要素を含有するプロモーターの使用を可能にする。特に好ましくい条件変異は、sir3-8である。sir3-8のような欠陥を有する酵母株は、例えば、イースト・ジェネティック・ストック・センター(Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, Calif.) から広範囲に入手することができるか、または変異および選択の常法を用いて調製することもできる。sir3-8変異は、交雑または変異および選択

の常法を用いることにより、MNN7、MNN8、MNN9、もしくはMNN10の遺伝子上に欠陥を含有する株に導入することができる。異種性タンパク質の産生を最大にするには、宿主細胞が、例えば、タンパク質分解活性の減少をもたらすpep4変異 (Jones, Genetics 85: 23~33, 1977) のような変異を伴うことが好ましい。

前述したように、調節されたMNN7、MNN8、MNN9またはMNN10発現単位は、このものがプラスミドに担持されているか取込まれたものであるかにかかわらず、第二のプロモーターおよび目的の異種性遺伝子またはcDNAに融合する分泌シグナルをコードする配列を含んでなる第二のDNA構成物と組み合わせて使用される。本発明の好ましい態様は、第二のプロモーターとしてクローン化されたMNN遺伝子の発現を司るものと相違する調節プロモーターを使用することである。この使用は、アウターチェーンオリゴサッカライド成分を含有するタンパク質生成物の産生を妨げるために異種性遺伝子またはcDNAの発現性を変化される能力を

付与する。好ましい分泌シグナルとしては、酵母MF α 1 (Kurjanら、米国特許第4,546,082号明細書; Singh、ヨーロッパ特許公開第123,544号公報)、PH05 (Beckら、国際公開、WO 86/00637号公報)、SUC2 (Carlsonら、Mol. Cell. Biol. 3: 439~447, 1983) およびBAR1 (Mackayら、米国特許第4,613,572号明細書; Mackey、国際公開、WO 87/02670号公報) の各遺伝子を挙げるができる。

目的の異種性遺伝子またはcDNAを含んでなる発現単位は、プラスミドに担持された調節される発現単位と同一のプラスミド上に担持されていてもよく、次いで宿主細胞が形質転換される。他方、異種性遺伝子またはcDNAを含んでなる発現単位は、別個のプラスミド上に存在するか、宿主のゲノムに組込まれていてもよい。組込みは、相同性部位で生ずる組換え現象であって、その部位でDNA配列の挿入をもたらす。これらの発現単位は、プラスミドに担持されているか、または組込まれている調節されるMNN遺伝子とのいずれかの組み合わせで使用することができる。これらの組み合

わせは、正常な糖タンパク質の合成を伴いながら、細胞の対数増殖期間を通じて細胞の増殖に害与えることなく、MNN遺伝子の正常な発現を可能にする。好ましい態様では、細胞が活発に増殖する間中、異種性遺伝子が発現されないように培養物の増殖条件が調節される。細胞が最高濃度に達した時に、増殖条件を選択的に改変し、これによってMNN遺伝子の発現を止め、変性コアグリコシル化を伴う異種性タンパク質生成物が合成されることを可能にする。本発明に従って産生され得る異種性タンパク質およびポリペプチドとしては、成長因子 (例えば、血小板由来成長因子)、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、免疫グロブリン、プラスミノゲン、トロンビン、ファクターXIIIおよびこれらの類似物が挙げられる。

本発明に従えば、分泌に向けられた糖タンパク質へのアウターチェーンオリゴサッカライドの付加を調節するための他の方法は、独特かつ予期し得ないmnn9断裂変異株の分離を包含する。この変

異株は、培養条件を操作することを要しないで変性コアグリコシル化を含む異種性糖タンパク質を産生し得る酵母宿主を提供する。mnn9の断裂は、前述のように行われた。具体的には、選択マーカー (URA3遺伝子) により中断されたMNN9をコードしている配列を含んでなるDNA構成物がSEY2101に導入された。形質転換体は、ウラシルの存在しない合成培地でのそれらの増殖能で選択された。形質転換体は、Mnn9⁻表現型の存在についてアッセイされた。サザン分析は、MNN9遺伝子の断裂を確認するために実施された。URA3マーカーおよび表現型Mnn9⁻の残存ならびにMNN9遺伝子が完全であることを表すサザン分析 (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503~517, 1975) のパターンを示す陽性のクローンが同定された。この菌株に由来するゲノムDNAのバルスフィールドゲル電気泳動 (Southernら、Nuc. Acids Res. 15: 5925~5943, 1987) は、mnn9断裂単離体が少なくとも染色体VおよびVIIIを包含する染色体変性を受けていることを示した。ZY300と称される株(ATCC 20870)は、

Ballouにより分離されている mnn9 点変異株 (前述、1980) または mnn9 の断裂株と確認されている他の株よりも早く増殖する。この株の分析は、浸透圧支持の不存在下でそれが明らかに増殖し得ることを示す。REP3 と複製起点を含むが REP1 または REP2 を含まない特定の酵母プラスミド (例えば YEpl3) による前記株の形質転換は、これらのプラスミドが親株に存在する変異 2 ミクロンのプラスミドのために不安定であることを示した。REP1, REP2, REP3 および複製起点を有するか、動原体断片および複製起点を利用する酵母ベクターは、前記菌株中で安定である。その株から変異 2 ミクロンのプラスミドを除去して野生型 2 ミクロンのプラスミドでそれを置換し、その株が YEpl3 型の酵母ベクターを利用できるようにするのが好ましい。外来タンパクの産生のために、プロモーターおよび分泌シグナルをコードする配列並びにこれに続く目的のポリペプチドまたはタンパク質をコードする配列を含んでなる DNA 構成物が、ZY300 株に導入される。プロモーターは、調節プロモーターで

あるか構成的プロモーターであってもよい。得られるタンパク質は、均一であり、そして特徴的な酵母の高グリコシル化を欠いている。ZY300 中には、pep4 断裂および mnn1 断裂の両方が導入されることが好ましい。これらのクローン化遺伝子の断裂は、前述の遺伝子断裂と同様に実施される。

真菌の形質転換技術は、文献でよく知られており、そして例えば、Beggs (前述)、Hinnenら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929~1933, 1978)、Russell (Nature 301: 167~169, 1983)、および Yeltonら、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1740~1747, 1984) に公表されている。宿主株は、ベクター上に存在する選択マーカーにより補完される遺伝子の遺伝的欠陥を有してもよい。かかる遺伝的欠陥としては、栄養要求性、例えば、スキゾサッカロミセス・ボムベ (Schizosaccharomyces pombe) の POT1 遺伝子により補完され得る tpi1 が挙げられる。特定の宿主および選択マーカーの選定は、当業者のレベル内のものである。

本発明により産生されるタンパク質は、常法に

より精製することができる。具体的な精製手順は、精製される個々のタンパク質の特性によって決定されるであろう。かかる決定も、当業者のレベル内にある。一般に、細胞培養物を細胞から分離し、次いで培養物からタンパク質を単離する。有用な単離技術としては、沈殿、免疫吸着および分画または種々のクロマトグラフ法が挙げられる。

例

例 1. S. セレビシエ MNN9 の遺伝子のクローニング

第 1 表

酵母の遺伝子型

LB347-1C	<u>MATα</u> <u>mnn9</u> <u>gal2</u>
ZA447	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>bar1-1</u> <u>gal2</u> <u>ura3</u>
XV732-1-9A	<u>MATα</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ura3</u> <u>mnn9</u> <u>gal2</u>
XP660-2A	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>bar1-1</u> <u>trp1</u> <u>gal2</u>
XCyl-5D	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ura3</u> <u>trp1</u> <u>mnn9</u>
SEY2101	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ade2-101</u> <u>ura3-52</u> <u>suc2-Δ9</u> <u>gal2</u> <u>Δpep4::CAT</u>

第 1 表 (続き)

酵母の遺伝子型

ZY100	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ade2-101</u> <u>ura3-52</u> <u>suc2-Δ9</u> <u>gal2</u> <u>Δpep4::CAT</u>
ZY300	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ade2-101</u> <u>ura3-52</u> <u>suc2-Δ9</u> <u>gal2</u> <u>mnn9::URA3::tl-1</u>
ZY400	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>ade2-101</u> <u>ura3-52</u> <u>suc2-Δ9</u> <u>gal2</u> <u>Δpep4::CAT</u> <u>Δmnn9::URA3</u>
381G-59a	<u>MATa</u> <u>sir3-8</u> <u>SUP4-3</u> <u>ade2-1</u> <u>his4-580</u> <u>lys2</u> <u>trp1-1</u> <u>tyr1</u> <u>cry1</u>
A2	<u>MATα</u> <u>leu2-3,112</u> <u>his3-11,15</u> <u>can1</u>
XL1-4B	<u>MATa</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1-1</u> <u>ade2-1</u> <u>lys2</u> <u>sir3-8</u>
XCyl5-3C	<u>MATα</u> <u>ade2-1</u> <u>leu2-3,112</u> <u>Δmnn9::URA3</u>
XCyl42-28B	<u>MATa</u> <u>sir3-8</u> <u>Δmnn9::URA3</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1-1</u> <u>ade2-1</u> <u>lys2</u> <u>Δpep4::CAT</u>
LB1-22D	<u>MATα</u> <u>mnn1</u> <u>gal2</u> <u>SUS2</u> <u>mal</u> <u>CUP1</u>

A. XCyl-5D 株の作製

mnn9 突然変異並びに URA3, LEU2 及び TRP1 遺伝子

中の遺伝的欠陥を有する S. セレビス 株を、前記表に列挙された親株を用いて作製した。使用される遺伝的方法及び培地は、一般的に当業界に既知である。(たとえば、R.K.Mortimer 及び D.C. Hawthorne, Yeast Genetics, A.H.Rose 及び J.S. Harrison、出版者、London: Academic Press, Inc., Ltd., 385~460 ページ; 及び Hartig など、前記を参照のこと。) L8347-1C 株 (Tsai など、J. Biol. Chem., 259: 3805~3811, 1984) を、ZA447 とクロスせしめた。二倍体を単離するために前記接合混合物から接合体が得られた。XV732 と命名された二倍体コロニーを孢子形成し、そして切開した。孢子の四分子分析は、孢子が浸透圧安定性を有さない培地上で増殖される場合、小コロニーについて 2:2 の分離比を示した。(浸透圧的に安定化されていない培地上での小コロニーの大きさは、mnn9 遺伝子の存在と相関関係を示した。) ロイシン及びウラシル栄養要求性を有するひじょうに小さなコロニーに発達した孢子を選択し、そして XV732-1-9A と命名した。この孢子を XP660

2A とクロスせしめた。二倍体を、80 mg/ℓ のロイシンを補充された最少培地 (第2表) 上で選択し、二倍体 XCV1 を得た。XCV1 を孢子形成し、切開した。四分子分析が、その孢子に対して行われた。孢子 XCV1-5D (MATα mnn9 leu2-3 leu2-112 trp1 ura3 gal1) を、MNN9 遺伝子をクロニングするための宿主株として選択した。

第2表

MinD

グルコース 20 g、
アミノ酸を含まないイースト・ニトロゲン・ベース (Yeast Nitrogen Base) (Difco Laboratories, デトロイト, ミシガン) 6.7 g、及び
寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。蒸留水を添加し、最終体積を 1 ℓ にする。15 分間オートクレーブ処理する。プレートに注ぎ、そして固化せしめる。

-LeuDS プレート

グルコース 20 g、

アミノ酸を含まないイースト・ニトロゲン・ベース (Difco Laboratories, デトロイト, ミシガン) 6.7 g、

アデニン 40 mg、

L-アルギニン 30 mg、

L-アスパラギン酸 50 mg、

L-ヒスチジノーフリー塩基 20 mg、

L-イソロイシン 60 mg、

L-リシンモノ塩酸塩 40 mg、

L-メチオニン 20 mg、

L-フェニルアラニン 60 mg、

L-セリン 50 mg、

L-チロシン 50 mg、

ウラシル 40 mg、

L-バリン 60 mg、

ソルビトール 60.75 g、及び

寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。蒸留水を添加し、最終体積を 1 ℓ にする。15 分間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、

L-トレオニン 150 mg 及び L-トリプトファン 40 mg を添加する。プレートに注ぎ、そして固化する。

-LeuDS

-LeuDS プレートのための処方を使用する (但し、寒天を除外する)。

-LeuD プレート

-LeuDS プレートのための処方を使用する (但し、ソルビトールを除外する)。

-LeuD

-LeuDS プレートのための処方を使用する (但し、ソルビトール及び寒天を除外する)。

-TrpDS プレート

グルコース 20 g、

アミノ酸を含まないイースト・ニトロゲン・ベース (Difco Laboratories, デトロイト, ミシガン) 6.7 g、

アデニン 40 mg、

L-アルギニン 30 mg、

L-アスパラギン酸 50 mg、

L-ヒスチジンフリー塩基 20 mg、
 L-イソロイシン 60 mg、
 L-ロイシン 80 mg、
 L-リシンモノ塩酸塩 40 mg、
 L-メチオニン 20 mg、
 L-フェニルアラニン 60 mg、
 L-セリン 50 mg、
 L-チロシン 50 mg、
 ウラシル 40 mg、
 L-バリン 60 mg、
 ソルビトール 60.75 g、及び
 寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。
 蒸留水を添加し、最終体積を 1 l にする。15 分
 間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、
 L-トレオニン 150mg を添加する。プレート上に
 注ぎ、そして固化する。

-TrpD

-TrpDS のための処方を使用する（但し、ソル
 ビトール及び寒天を除外する）。

間オートクレーブ処理する。プレート上に注ぎ、
 そして固化する。

YEPD

YEPD プレートのための処方を使用する（但し、
 寒天を除く）。

-UraDS プレート

グルコース 20 g、
 アミノ酸を含まないイースト・ニトロゲン・ベー
 ス (Difco Laboratories, デトロイト, ミシガン)
 6.7 g、
 アデニン 40 mg、
 L-アルギニン 30 mg、
 L-アスパラギン酸 50 mg、
 L-ヒスチジンフリー塩基 20 mg、
 L-イソロイシン 60 mg、
 L-ロイシン 80 mg、
 L-リシンモノ塩酸塩 40 mg、
 L-メチオニン 20 mg、
 L-フェニルアラニン 60 mg、
 L-セリン 50 mg、

YEPDS プレート

グルコース 20 g、
 Bacto-ペプトン (Difco) 10 g、
 酵母エキス (Difco) 20 g、
 ソルビトール 60.75 g、及び
 寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。
 蒸留水を添加し、合計体積を 1 l にする。25 分
 間オートクレーブ処理する。プレート上に注ぎ、
 そして固化する。

YEPDS

YEPDS プレートのための処方を使用する（但し、
 寒天を除外する）。

YEPD プレート

グルコース 20 g、
 Bacto-ペプトン 10 g、
 酵母エキス 20 g、及び
 寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。
 蒸留水を添加し、合計体積を 1 l にする。25 分

L-チロシン 50 mg、
 L-バリン 60 mg、
 ソルビトール 60.75 g、及び
 寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。
 蒸留水を添加し、最終体積を 1 l にする。15 分
 間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、
 L-トレオニン 150mg 及び L-トリプトファン
 40 mg を添加する。プレート上に注ぎ、そして固
 化する。

-Leu-TrpDS

グルコース 20 g、
 アミノ酸を含まないイースト・ニトロゲン・ベー
 ス (Difco Laboratories, デトロイト, ミシガン)
 6.7 g、
 アデニン 40 mg、
 L-アルギニン 30 mg、
 L-アスパラギン酸 50 mg、
 L-ヒスチジンフリー塩基 20 mg、
 L-イソロイシン 60 mg、

L-リシンモノ塩酸塩 40 mg、
 L-メチオニン 20 mg、
 L-フェニルアラニン 60 mg、
 L-セリン 50 mg、
 L-チロシン 50 mg、
 ウラシル 40 mg、
 L-バリン 60 mg、
 ソルビトール 60.75 g、及び
 寒天 18 g。

これらのすべての成分を蒸留水中で混合する。蒸留水を添加し、最終体積を1ℓにする。15分間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、L-トレオニン 150mgを添加する。プレート上に注ぎ、そして固化する。

Mg+CA+amp+W

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6 g、
 KH_2PO_4 3 g、
 NaCl 0.5 g、
 NH_4Cl 1 g、
 カサミノ酸 5 g、

ホスファターゼにより脱リン酸化されたpUC8中に連結した。その連結混合物を用いてE・コリ株JM83を形質転換した。その得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、そしてBam HIにより切断し、CEN3フラグメントの存在を決定した。陽性クローンをEco RI及びBam HIにより消化し、その挿入部の方向を決定した。正しい方向にCEN3断片を有するクローンをpM101Bと命名した。プラスミドpM101BをBam HIによる消化により線状化し、そしてDNAポリマラーゼIのクレノウフラグメントにより処理して接着端を平滑末端化した。その線状化されたプラスミドを再環状化した。その得られたプラスミドpM102Aを、Hinc IIによる消化により線状化し、そして次にEco RIにより切断し、0.6 KbのCEN3フラグメントを単離した。Hinc II-Eco RIフラグメントをDNAポリマラーゼIのクレノウフラグメントにより処理し、Eco RI接着端をフィルインし、平滑末端を有する0.6 KbのCEN3フラグメントを得た。IRP1遺伝子の5'末端に対して遠位の破壊されたEco RI部位を有するYRp7を

1 Mの MgSO_4 1 ml、
 0.5 Mの CaCl_2 0.2 ml、
 40%のグルコース 5 mg、
 1 mg/mlのチアミンB1 10 ml、及び
 10 mg/mlのL-トリプトファン 2 ml。

これらの成分を蒸留水中に溶解する。蒸留水を添加し、最終体積を1ℓにする。25分間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、アンピシリン 100mgを添加する。

Mg+CA+amp

Mg+CA+amp+Wのための処方を用いる(但し、トリプトファンを除く)。

B. プラスミドpM111の作製

第2図に示されるように、YRp7 (Stinchcombなど、前記)ベクター配列及び酵母セントロメアCEN3を含む酵母シャトルベクターを作製した。

pYe(CEN3)41 (Clarke及びCarbon, *Nature* 287:

504~509, 1980)に由来する酵母CEN3配列を含有する630bpのBam HI-Sau 3A断片を、Bam HIによる消化により線状化され、そして細菌性アルカリ

含んでなるプラスミドpFRT-1を、Pvu IIによる消化により線状化した。そのpFRT-1線状断片を、0.6 KbのCEN3断片に連結し、そしてその連結混合物を用いてE・コリ株RR1を形質転換した。その得られた形質転換体から調製されたDNAをEco RIにより消化し、挿入部の存在を確認し、そしてCEN3挿入部の方向を決定した。(1つの方向においては、Pvu II平滑末端への連結によりEco RI部位が再生される。)その得られたプラスミドをpM111と命名する。

C. MNN9の遺伝子のクローニング

ベクターpM111中にクローン化されたX2180株(ATCC 26109)からの酵母ゲノム断片のプールを、MNN9遺伝子を単離するための出発材料として使用した。簡単に言えば、ゲノムDNAをSau 3Aにより部分的に切断し、そしてその得られたゲノム断片をベクターpM111のBam HI部位中にクローン化した。挿入部の平均サイズは8 Kbであった。

pM111中のゲノムDNAのプールを、Beggs (*Nature* 275: 104~108, 1978)により記載され

ているようにしてXCY1-5D株中に形質転換した。形質転換体を、-TrpDS プレート（第2表）上で増殖するそれらの能力により選択した。

その形質転換コロニーを再懸濁し、そしてHackay (*Methods in Enzymology* 101: 325~343, 1983) により記載されている方法を用いて再プレートした。形質転換体コロニーを上層寒天に再懸濁し、混合し、そして-TrpD（第2表）+ 0.5 MのKCl中に再懸濁して前記寒天上部から細胞を除去した。この混合物を、30℃で2時間増殖せしめ、そして-TrpDS プレート上にプレートした。コロニーを30℃で-TrpDS プレート上で増殖せしめた。次に、コロニーを、グリッド構成をなすマスター-TrpDSプレート上に移した。そのマスタープレートのレプリカを-TrpDS プレート上に作製し、そして増殖せしめ、その後MNN9の表現型を決定した。

およそ3,000の陽性コロニーを、下記のセクションDに記載の方法を用いて、MNN9表現型の存在についてアッセイした。16のコロニーが、宿主株中に存在するmnn9突然変異に確実に補完するこ

とが見出され、そしてそのようにするそれらの能力は、プラスミドの存在と関連した。プラスミドDNAを、Hartigなど、(*Mol. Cell. Biol.* 6: 2106~2114, 1986) により記載されているようにして前記16の陽性コロニーから単離し、そしてE・コリ株RR1中に形質転換した。プラスミドDNAをE・コリ形質転換体から単離し、そして制限酵素分析にかけた。15のプラスミドが2つの共通XbaI部位を示した。

mnn9株中に形質転換される場合、Mnn+表現型を回復する最小挿入部を有するプラスミドを、pZY23と命名した。プラスミドpZY23は、pM111中の6Kbの酵母ゲノムDNA挿入部を含有した。pZY23中に存在するゲノムDNA挿入部のサブクローンを構成し、そして捕完性を調べるためにそれを用いてXCY1-5D株を形質転換した。第3図に示されるように、pZY23をCiaI及びBglIIにより消化することによって、pZY23のサブクローンを構成し、MNN9遺伝子を含有する3.1Kbの断片を単離した。次に、その断片を、CiaI及びBglII

による消化により線状化されたpM111中に連結した。その得られたプラスミドpZY37を、American Type Culture CollectionにE・コリ株RR1形質転換体として寄託した(ATCC No.67550)。クローン化された挿入部の2.4KbのBglI-SstI断片は、補完のために十分であることが見出された。この断片を、BamHI及びSstIによる消化により線状化されたpIC19H(Marshなど、*Gene* 32: 481~486, 1984; ATCC 37408)中にサブクローン化した。この得られたプラスミドをpZY48(第3図)と命名した。

D. アッセイ方法

コロニーの調製:

適切に増殖した細胞を、2種の方法の1つにより溶解した。第1の方法においては、YEPDS(第2表)中で増殖したコロニーをクロロホルムにより処理し、細胞を透過性にした。そのプレートを、クロロホルムにより飽和されたペーパータオル上に逆さにした(室温で5分間にわたって)。次に、そのプレートを30分間垂直に置き、アッセイす

る前、クロロホルムを蒸発せしめた。

第2の方法が、プラスミドを維持するために合成培地上での選択的増殖条件を必要とするコロニーのために使用された。合成培地+1Mのソルビトール上で増殖したコロニーを、まずニトロセルロースフィルター(Schleicher & Schuell, Keene, N.H.)に移した。円形のニトロセルロースフィルターを、そのフィルターが完全に湿潤するまで、合成培地+1Mのソルビトール上で増殖されたコロニーの上部に置いた。次に、そのフィルターを寒天の表面から注意深くはぎ取り、そして30秒間液体窒素中に浸した。これにより細胞を効果的に破壊した。次に、フィルターを、アッセイするためにYEPDプレート(第2表)上に細胞側を上にして置いた。

アッセイ方法:

基質を下記のように調製した:

プレート当たり: 2%寒天2mlを溶解し、55℃で保持し、0.5MのNaH₂PO₄(pH7.0)1mlを添加し(55℃)、2%ドデシル硫酸ナトリ

ウム 0.1 ml を添加し (55℃)、蒸留水 6.4 ml を添加し (55℃)、2 mg/ml のシクロヘキシイミド (Sigma, セントルイス, ミズーリ) 0.5 ml を添加し、そしてアゾコール (Sigma) 100 ml を添加した。

アゾコールは溶解しない。その混合物を攪拌し、そしてプレート又はフィルター上のコロニー上に上層としてすばやく注いだ。

そのプレートを 37℃ で 5～8 時間インキュベートした。Mnn9⁻ 表現型を示すコロニーは、そのコロニーのすぐ周りのアゾコールを分解することができ、mnn9⁻ コロニーの周りに透明なハローをもたらしした。

例 2. MNN9 遺伝子の断片

MNN9 遺伝子を断片するために、第 3 図に示すように MNN9 遺伝子中のユニーク Hind III 部位と Eco RI 部位との間のコード領域を URA3 遺伝子が置換しているプラスミドを作製した。プラスミド pIC19R 中に URA3 遺伝子 (YEp24 に由来する; Botstein など、Gene 8: 17, 1979) をコードする 1.3 Kb の

Hind III 断片を含んで成るプラスミド p1148 を、Hind III 及び Xma I により消化し、1.1 Kb の URA3 断片を単離した。この断片を、Hind III 及び Xma I による消化により線状化された pIC19R 中に連結した。この得られたプラスミド、pZY61 を Hind III 及び Eco RI により消化し、1.1 Kb の URA3 断片を単離した。プラスミド pZY48 を Eco RI 及び Sal I により消化し、MNN9 の 3' 部分をコードする 1.2 Kb の断片を単離した。この断片を、URA3 断片及び pUC13 (Hind III 及び Sal I による消化により線状化されている) と 3 部分連結により連結せしめた。その得られたプラスミド pZY62 を、Hind III 及び Sal I により消化し、MNN9 遺伝子の 3' 部分に融合された URA3 遺伝子を含んで成る 2.3 Kb の断片を単離した。プラスミド pZY48 を Sst I 及び Hind III により消化し、0.44 Kb の MNN9 断片を単離した。この断片を、pZY63 及び pUC13 (Sst I 及び Sal I により線状化されている) からの断片と 3 部分連結により連結した。得られたプラスミド pZY63 は、URA3 遺伝子により断片化された MNN9 遺伝子を含んで成る

(第 3 図)。

ゲノム MNN9 を、Rothstein (前記) により記載された方法を用いて、SEY2101 及び ZY100 株 (第 1 表) 中で断片した。プラスミド pZY63 を Sst I 及び Sal I により消化し、URA3 遺伝子により断片化された MNN9 コード領域を含む 2.7 Kb のフラグメントを単離した。このフラグメントを、酵母株 SEY2101 及び ZY100 中に形質転換した。その形質転換体を、-URADS プレート (第 2 表) 上で増殖するそれらの能力に対して選択した。次に形質転換体を、MNN9 座で線状 DNA フラグメントの組込みを示す Mnn9⁻ 表現型 (例 1. D) の存在についてアッセイした。陽性クローンを、非選択性培地上での増殖により URA3 マーカーの安定性について試験した。陽性クローンを YEPDS (第 2 表) 5 ml 中に接種し、そして 30℃ で一晩増殖せしめた。その一晩の培養物 1 ml を新しい YEPDS 5 ml 中に希釈し、そして 30℃ で一晩増殖した。その 2 番目の一晩の培養物 1 ml を 1 M のソルビトール 10 ml 中に希釈した。1 M のソルビトール 100 ml に添加された前記混合

物 10 ml を YEPDS プレート上に培養した。これらのプレートを 30℃ で 24 時間インキュベートした。URA3 マーカーの安定性について試験するために、コロニーを -UraDS 上にレプリカ培養した。クローンのすべては安定していた。

サザンブロット分析を、組込み現象を確かめるために形質転換体に対して行なった。ゲノム DNA を Davis など、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2432～2436, 1983) によって記載された方法により調製し、そして Eco RI 及び Sst I により切断した。消化物を 0.7% アガロースゲル中で電気泳動し、そして Southern (前記、1975) により記載された方法に従ってニトロセルロースフィルター上にブロットした。Amersham ランダムプライミングキット (Amersham, Arlington Hts., イリノイ) によりランダムにプライムされた MNN9 のコード領域 (例 1. C.) を含有する、pZY48 からの 2.3 Kb の Hind III - Hind III フラグメントにより、前記フィルターをプローブした。ZY100 中での断片体 (ZY400 と命名された) を、サザン法に基づいて 1.5

及び1.55Kbのラベルされたフラグメントの存在により確かめた。遺伝子の断裂を示さない SEY2101株中での断裂体から、クローン(ZY300と命名された; ATCC取得番号20870)を単離した。さらなる実験はMnn9⁻表現型の存在を確かめた。

バルスフィールドゲル電気泳動(Southernなど、前記、1987)を、ZY300及びZY400並びにそれらの親株に由来するゲノムDNAに対して行なった。ゲノムDNAを、Overhauser及びRadic(BRL Focus 9: 8~9, 1987)により報告されたアガロースビーズ方法の変法を用いて調製した。簡単には、一晚の培養物を、YEPDS 15ml中において30℃で培養した。その培養物を遠心分離し、その上清液を除去し、そしてそのベレットをSCE(1Mのソルビトール、0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH5.8, 0.01MのNa₂EDTA, pH8.0) 5ml中に再懸濁した。その細胞懸濁物を、50mlの三角フラスコに移した。55℃で維持されたパラフィン油10ml及び55℃で維持された2.5%低ゲル化アガロース(Sea Plaque Agarose, FMC Corp.

Bioproducts, ロックランド, メイン) 1mlを、それぞれのフラスコに添加した。その細胞スラリーを、細かなエマルジョンが得られるまで、最大回転速度で1分間激しく混合した。そのエマルジョンを、攪拌しながら、氷-水浴中で急速に冷却せしめた。冷却の後、そのエマルジョンを50mlのポリスチレン管に移し、そして20mlのTE8(10mMのTris-HCl, 1mMのEDTA, pH8.0)を添加した。その溶液を2500rpmで5分間、遠心分離し、そしてその後、パラフィン油及び上清液を除去した。アガロースビーズを含むベレットを、30mlのTE8中に再懸濁し、そして前記段階に記載されたようにして遠心分離した。上清液を除き、そしてスフェロプラスト緩衝液(ビーズ2mlに関して: SCE 3ml, 0.5MのEDTA(pH9.0) 2ml, 1mgのチモリアーゼ60,000(Miles, Elkhart, Ind.), 0.25mlのβ-メルカプトエタノール(Sigma, St. Louis, MO.))を添加した。その溶液を、回転ドラム上で1時間37℃でインキュベートし、そしてその後、その溶液を前記のようにして遠心分離した。上清液を

除き、そして0.5MのEDTA(pH9.0) 1mlを補充し、そして4℃で貯蔵した。

酵母の染色体を、Southernなど、(前記、1987)により実質的に記載されているようにして分離した。1%アガロースゲル中、バルスフィールドゲル電気泳動(Seakem Agarose, FMC Corp. Bioproducts, ロックランド, メイン)を、Rotogel(Moonlight Cat Door Company, シアトル, ワシントン)を用いて行なった。酵母のDNAを、臭化エチジウムによる染色により可視化した。その染色されたゲルの分析は、ZY300株が少なくとも染色体V及びVIIが関与した染色体転位を受けたことを示した。サザンブロットを、前記のようにしてゲルから製作し、そしてまず、pZY48に由来する2.3KbのHind III-Hind III Mnn9フラグメントにより、そして次にp1148に由来する1.3KbのHind III-Hind III URA3フラグメントによりプローブした(例2)。そのプローブはAmershamランダムプライミングキット(Amersham, Arlington Hts., イリノイ)を用いてラベル化した。サザンブロット

の結果は、ZY300及びZY400の両者において、Mnn9のコード領域のすべてが染色体XVI(Mnn9のための天然の部位)にマッピングされ、そしてURA3が予定通りに染色体XVI及びVにマッピングされていることを示した。

例3. mnn9欠失株におけるバリアーの発現

BARI遺伝子を含んで成るDNA構成物を、例2において生成したmnn9欠失株及び親株に形質転換してバリアー(Barrier)タンパク質のグリコシル化を試験した。BARI遺伝子生成物であるバリアー(Barrier)は高度にグリコシル化することが示されている分泌されるタンパク質である。ADHIプロモーター、物質P(Munro及びPelham, EMBO J. 3: 3087-3093, 1984)のC-末端部分のコード領域に融合しているBARIコード領域及びTPI1ターミネーターを含んで成るプラスミドpSW24を次のようにして(第5図)作製した。完全なBARIコード領域及びその関連するフランキング領域を含んで成るプラスミドpZV9をSal I及びBam HIにより切断して1.3kb BARI断片を単離した。この断片を、

Sal I 及び Bam HI により切断された pUC13 にサブクローニングして pZV17 と称するプラスミドを生成せしめた (第4図)。プラスミド pZV17 を Eco RI で消化して BAR1 コード領域の最も 3' 側の 0.5 kb を除去した。ベクター-BAR1 断片を再連結して pJH66 と称するプラスミドを形成した。プラスミド pJH66 を Eco RI により線状化し、そして DNA ポリメラーゼ I (Klenow 断片) により平滑末端とした。キナーゼ処理された Bam HI リンカー (5'-CCGGATCCGG-3') を添加し、そして Bam HI により消化して過剰のリンカーを除去した後に再連結した。生ずるプラスミドを pSW8 と命名した。プラスミド pSW8 を Sal I 及び Bam HI により切断してバリアーのアミノ酸 252 から 526 までをコードする 824bp 断片を単離した。バリアーのアミノ酸 252 から 526 までをコードする合成オリゴヌクレオチド配列を含有するプラスミド pPM2。M13mp8 中の物質 P の C-末端部分のダイマー形をコードする合成オリゴヌクレオチド配列を含有するプラスミド pPM2 を Munro 及び Pelham から入手し

た。プラスミド pPM2 を Bam HI 及び Sal I を用いる消化により線状化し、そして pSW8 からの 824bp BAR1 断片に連結した。生ずるプラスミド pSW14 を Sal I 及び Sma I により消化して 871bp BAR1-物質 P 断片を単離した。BAR1 のアミノ酸 1 から 250 までをコードする断片を含んで成るプラスミド pZV16 を Xba I 及び Sal I 切断して 767bp BAR1 断片を単離した。この断片を 871bp BAR1-物質 P 断片と、Xba I 及び Sma I により切断された pUC18 と共に三部分連結した。pSW15 と称する、生ずるプラスミドを Xba I 及び Sma I により消化して 1.64kb BAR1-物質 P 断片を単離した。ADH1 プロモーター及び pUC18 (MacKay, WO 87/02670) 中の BAR1 の 5' コード領域の 116bp を含んで成る pRL029 から ADH1 プロモーターを得た。プラスミド pRL029 を Sph I 及び Xba I により消化して 0.42kb ADH1 プロモーター断片を単離した。TPI1 ターミネーター (Aiber 及び Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 410-434, 1982) を、pUC18 (Eco RI-Sph I) に連結された TPI1 ターミネーター (平滑末端化された

Xba I-Eco RI) 0.7kb を含有する平滑末端化された Xba I-Sph I 断片として得た。この断片を、0.42kb ADH1 プロモーター断片及び 1.64kb BAR1-物質 P 断片と三部分連結により連結してプラスミド pSW22 を生成せしめた。プラスミド pSW22 を Sph I 及び Sma I により消化して 2.8kb 発現ユニットを単離し、これを、Sph I 及び Pvu II による消化によって線状化された YEp13 に連結した。生ずるプラスミドを pSW24 と命名した (第5図)。

プラスミド pSW24 を mn9 欠失株 pZY300 及び pZY400 並びにこれらの親株 SEY2101 及び pZY100 に形質転換した。形質転換体を、-LeuDS プレート (第2表) 上で増殖する能力について選択した。形質転換体を 5 ml の -LeuDS (第2表) に接種し、そして 30℃ にて一夜インキュベートした。500 µl の一夜培養物を 50 ml の -LeuDS に接種し、そして 30℃ にて 48 時間インキュベートした。培養物を遠心し、そして上清を 250 ml の遠心ビンにデカントした。-20℃ で保持された同容量の 95% エタノールを加え、そして混合物を渦動攪拌し、

そして -20℃ にて 30 分間インキュベートした。次に、混合物を 9,000rpm にて 30 分間 GSA (ソルバル) ローター中で遠心した。上清を廃棄し、そしてタンパク質のペレットを室温にて一夜乾燥した。乾燥したペレットを 500 µl の蒸留水に再懸濁した。

50 µl の 2×サンプル緩衝液 (第3表) を再懸濁されたサンプルの各々に添加し、そしてサンプルを 10% ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、そして Towbin 等 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4353, 1979) により記載された方法を用いてニトロセルロースに移した。ニトロセルロースフィルターをラット抗-物質 P (Capell, Malvern, Pa) によりプローブし、そして西洋ワサビパーオキシダーゼ接合ヤギ抗-ラット抗体を用いて可視化した。イムノプロットは、mn9 欠損株 ZY300 及び ZY400 中の抗-物質 P 抗体により認識される均質種を示し、これらの株により生産されるバリアータンパク質が均一であることが示された。親株は、抗-物質 P 抗体により認識される不

均質な超グリコシル化種を示した。

pSW24形質転換体を次に様にしてバリアー活性について測定した。形質転換された酵母細胞によるバリアー生産の検出のために使用される測定は、 α -ファクターに暴露された感受性細胞の増殖の阻害を逆転させるバリアーの能力に頼る。 α -ファクターに異状に感受性である RC629 (MAIa bar1) のとき試験株を用いて、寒天プレート上の軟寒天中にラウン(lawn)を調製した。十分な量の α -ファクター (0.05-0.1 ユニット、Manny, J. Cell. Biol. 96: 1592-1600, 1983) を上層に加えて細胞の増殖を阻害した。バリアーの生産についてスクリーニングされるべき形質転換体を前記ラウン上にスポットした。形質転換された細胞によるバリアーの分泌がスポットの近傍の周囲の α -ファクター増殖阻害を逆転せしめ、これによって感受性細胞の回復が可能となった。回復された細胞は、形質転換された細胞のコロニーの通常平滑な縁の周囲の周辺増殖として観察された。この周辺の存在により、形質転換された株中のブラ

スミドがバリアータンパク質の発現及び分泌を指令することが示された。形質転換体は活性なバリアー蛋白質を生産することが示された。

例4. mnn9欠失株からの組織プラスミノゲン活性化因子の発現

組織プラスミノゲン活性化因子(tPA) cDNAを含んで成るDNA構成物をmnn9欠失株ZY400に形質転換して、生産されたタンパク質のグリコシル化を試験した。TPIIプロモーター、成熟tPA cDNA配列のセリンコドンに融合したMP α 1シグナル配列及びTPIIターミネーターを含んで成るプラスミドpDR1498(酵母形質転換体E8-11C株、ATCC# 20730として寄託されている)をZY400株及びその親株ZY100に形質転換した。

形質転換体を、-LeuDSプレート(第2表)上で増殖するその能力について選択した。

形質転換体を例3に記載したようにして増殖せしめた。30℃にて48時間の増殖の後、培養物を25mlのアリコートに分け、そして遠心した。一セットの25mlアリコートからの上清をデカン

とし、そして-70℃にて保存した。これらのそれぞれのベレットも-70℃にて保存した。

残った細胞ベレットに対して次の様にして細胞抽出を行った。1mlのリン酸緩衝化塩溶液(PBS: Sigma, セントルイス, M. から得られる)+1mM EDTAを全容量の半分に加えた。混合物を全速で2.5分間渦動攪拌し、渦動攪拌の間に氷上でサンプルを冷却しながらこれを3回行った。細胞溶解物をエッペンドルフ小遠心管(Binkmann, ウェストバレー, N.Y.)中で最高速度で10分間4℃にて遠心した。可溶性細胞タンパク質を含んで成る上清を取り出し、そして-70℃にて貯蔵した。ベレットを1mlの2×TNE(100mM Tris-塩基、200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP40, pH8.0に調整)で洗浄した。混合物を渦動攪拌し、そして前記のようにして遠心した。膜タンパク質画分を含んで成る上清を取り出し、そして-70℃にて貯蔵した。

例5. 温度で調節されるMNN9遺伝子

TPIIプロモーターをプラスミドpTPIC10 (Alder

及びKawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1: 410-434, 1982)、及びプラスミドpFATPOT(Kawasaki及びBell, EP 171,142; ATCC 20699)から得た。プラスミドpTPIC10をユニークKpnI部位で切断し、TPIIコード領域をBcl-31エキソスクレーパーで除去し、そしてこのプロモーターの3'末端にEcoRIリンカー(配列: GGAATTCC)を付加した。

BglII及びEcoRIによる消化がBglII及びEcoRI接着末端を有するTPIIプロモーターをもたらした。次にこの断片を、BglII及びEcoRI(部分的)により切断されたプラスミドpYRp7⁺(Stinchcomb等、Nature 282: 39-43, 1979)に連結した。生ずるプラスミドpTE32をEcoRI(部分的)及びBamHIにより開裂せしめてテトラサイクリン耐性遺伝子の部分を除去した。次に、線状化されたプラスミドをEcoRI-BamHIリンカーの付加により再環化してプラスミドpTEA32を得た。プラスミドpTEA32をBglII及びEcoRIで消化し、そして約900bpの部分的TPIIプロモーター断片をゲル精製した。プラスミドpIC19H(Marsh等、Gene 32: 481-486, 1984)

を Bgl II 及び Eco RI で切断し、そしてベクター断片をゲル精製した。次に、TP11プロモーター断片を線状化された pIC19H に連結し、そしてこの混合物を用いて E・コリ R R I を形質転換した。プラスミド DNA を調製し、そして約 900bp の Bgl II - Eco RI 断片の存在についてスクリーニングした。正しいプラスミドを選択し、そして pICTPIPI と命名した。

次に TP11プロモーターをサブクローニングしてその末端に便利な制限部位を設けた。プラスミド pIC7 (Marsh 等、前掲) を Eco RI で消化し、断片の末端を DNA ポリメラーゼ I (Klenow 断片) により平滑末端にし、そしてこの線状 DNA を T4 DNA リガーゼを用いて再環化した。得られる連結混合物を使用して E・コリ R R I を形質転換した。形質転換体からプラスミド DNA を調製し、そして Eco RI 部位の喪失についてスクリーニングした。正しい制限パターンを有するプラスミドを pIC7RI* と命名した。プラスミド pIC7RI* を Hind III 及び Nar I で消化し、そして 2500bp 断片をゲル精製し

た。部分的 TP11プロモーター断片 (約 900bp) を pICTPIPI から Nar I 及び Sph I を用いて取り出し、そしてゲル精製した。TP11プロモーターの残りをプラスミド pFATPOT から次の様にして得た。ことプラスミドを Sph I 及び Hind III で消化し、そして TP11プロモーターの部分を含む 1750bp 断片をゲル精製した。pIC7RI* 断片、pICTPIPI からの部分的 TP11プロモーター断片、及び pFATPOT からの断片を三部分連結により連結して pMVR1 (第 6 図を生じさせた)。

第 6 図に示すように、次に MAT $\alpha 2$ オペレーター配列を TP11プロモーターに挿入した。pUC9 の 2.7 kb の Sal I - Bam HI 断片をプラスミド pMVR1 由来の TP11プロモーターの 0.9 kb の Xho I - Bam HI 断片と連結することによりプラスミド pSXR101 を作製した。次に、プラスミド pSXR101 中の TP11プロモーターの Sph I 部位をユニーク Xho I 部位に変えた。pSXR101 DNA を Sph I で開裂せしめ、そして標準的方法 (Maniatis 等編集、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor,

New York, 1982) に従って脱リン酸化した。Sph I - I - Xho I アダプター (GCTCGAGCCATG) を、20p node のこのオリゴヌクレオチド、50mM Tris-HCl (pH 7.6)、10mM MgCl₂、5mM DTT、0.1mM スベルミジン、1mM ATP、及び 5 ユニットのポリヌクレオチドキナーゼを含有する別個の反応混合物中 20 μ l の反応容積にて 37℃ にて 30 分間キナーゼで処理した。このキナーゼ処理された Sph I - Xho I アダプターを Sph I で切断した pSXR101 と連結し、そしてこの連結混合物を用いて E・コリ R R I を形質転換した。挿入されたアダプターを有する制限酵素分析により同定し、そして pSXR102 と命名した (第 6 図)。MAT $\alpha 2$ オペレーターを特定するオリゴヌクレオチド (因子 609 : 5' - TCGAG TCA TGT ACT TAC CCA ATT AGG AAA TTT ACA TGG - 3'、及び 5' - TCGA CCA TGT AAA TTT CCT AAT TGG GTA AGT ACA TGA C - 3') を前記のようにしてキナーゼ処理した。プラスミド pSXR102 を Xho I で切断し、そして標準的方法により脱リン酸化した。プラスミド DNA 対オリゴ

ヌクレオチドのモル比を 1 : 1, 1 : 3、及び 1 : 6 として 3 種類の独立した連結を行った。生ずる連結混合物を使用して E・コリ R R I を形質転換した。挿入されたオリゴヌクレオチドを有するプラスミドをコロニーハイブリダイゼーション及び制限酵素分析により同定した。次の DNA 配列決定により、pSXR104 が 2 コピーの MAT $\alpha 2$ オペレーターを含有していることが示された。

次の段階において、プラスミド pSXR104 を Bam HI で切断し、標準的方法 (Maniatis 等編集、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982) に従って脱リン酸化し、そして E・コリ lac Z 遺伝子を含有する 3.2kb Bam HI - Bam HI 断片に連結した。この連結混合物を使用して E・コリ R R I 株を形質転換した。適切な方向に lac Z 断片を含有するプラスミドを pSXR111 と称する。

第 7 図に示すように、MNN9 遺伝子をプラスミド pSXR111 中に存在するハイブリッドプロモーターの制御のもとにおいた。プラスミド pZY48 を Hind III

及び Pst I により消化して 0.56kb MNN9断片を単離した。この断片を Dde I で切断して0.36kbの MNN9断片を単離した。オリゴヌクレオチド ZC1429 (5' -TTA GGC GGT ACG ATA CAA GAG AAA GTG ACA TTG TTT CCT G-3')、及び ZC1430 (5' AAT TCA GGA AAC AAT GTC ACT TTC TCT TGT ATC GTA CCG CC 3') をキナーゼ処理し、そして Maniatis 等 (前掲) により本質的に記載されている方法によりアニールした。このキナーゼ処理されそしてアニールされたオリゴヌクレオチドは、Eco RI 接着末端、これに続く 3.7 kb の MNN9コード領域及び Dde I 接着末端を有するアダプターを形成する。ZC1429/ZC1430 アダプターを、Eco RI 及び Pst I による消化によって線状化された pUC13 と共に、三部分連結により pZY48 からの Dde I - Pst I 断片に連結した。MNN9遺伝子に融合した ZC1429/ZC1430 アダプターを含んでなる生ずるプラスミドを pZY64 と命名した。

プラスミド pZY64 を Eco RI 及び Pst I で消化して 0.4 MNN9断片を単離した。pZY23 からの 1.5 kb

の Pst I - Bgl II 断片及び YEpl3 ベクター配列を含んで成るプラスミド pZY38 を Pst I 及び Bgl II で消化して 1.5kb MNN9断片を単離した。プラスミド pSXR111 を Hind III 及び Eco RI で消化して 0.9 kb ハイブリッドプロモーター断片を単離した。この断片を、pZY38 からの 1.5 kb の Pst I - Bgl II 断片、pZY64 からの Eco RI - Pst I 断片、並びに Hind III 及び Bgl II を用いる消化により線状化された pIC19R と共に、四部分連結により連結した。得られるプラスミドを pZY65 と称する。プラスミド pZY65 を Bgl II 及び Pvo I と称する。発現ユニットを含有する 2.8 kb の Bgl II - Bgl II 断片を単離した。プラスミド pM111 を Bam HI による消化によって線状化し、そして pZY65 からの発現ユニットを含んで成る 2.8 kb の Bgl II 断片と連結した。生ずる連結混合物を E・コリ RR1 株に形質転換した。プラスミド DNA を形質転換体から調製し、そして Hind III 及び Eco RI で切断して挿入部の方向を決定した。正しい方向で発現ユニットを有するプラスミドを pZY566 と命名した。

例 6. 温度により調節される MNN9遺伝子の発現

A. XCY42-82B 株の作製

sir3-8 変異、MNN9遺伝子中の欠失、並びに少なくとも LEU2遺伝子及び TRP1遺伝子の遺伝的欠陥を有する *S. cerevisiae* 株を次の様にして作製した。すべての株の遺伝子形が第 1 表に挙げてある。381G-59A 株 (Hartwell, *J. Cell. Biol.* 85: 811-822, 1980) を A'2 株 (Roby 等, *Meth. Enzymol.* 101: 253-269, 1983) とクロス (cross) し、そして二倍体を選択して胞子を形成せしめた。子のうを切開し、そして遺伝子型 MAT α , leu2-3, 112 trp1-1 ade2-1 lys2 sir3-8 を有する胞子を XL1-4B と命名した。ZY400 (pSW24) 株及び ZA447 株をクロスし、そして 2 倍体株を選択した。二倍体細胞を常法に従って胞子形成せしめ、そして子のうを切開した。得られた胞子について四分子分析 (tetrad analysis) を行った。遺伝子型 MAT α ade2-1 leu2-3, 112 Δ mnn9::URA3 を有する胞子を選択した。この胞子を XCY15-3C と称する。

XCY15-3C 株及び XL1-4B 株をクロスして二倍体 XCY42 を生じさせた。この二倍体株を胞子形成せしめ、そして子のうを切開した。遺伝子型 MAT α sir3-8 Δ mnn9::URA3 leu2-3, 112 trp1-1 ade2-1 lys1 を有する胞子を選択した。

B. trpE-BAR1 融合体に向けられたポリクローナル抗体の製造

trpE-バリアーアクションパク白に対するポリクローナル抗体を生じさせた。trpE-バリアーアクションパク質が、pSW242 により形質転換された E・コリ RR1 から生産された。プラスミド pSW242 は次の様にして作製した。プラスミド pSW22 (例 3) を Eco RI で消化して 1.47kb BAR1断片を単離した。プラスミド pATH11 (Morin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7025-7029, 1985; pATH2 (Dieckmann 及び Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* 260: 1513-1520, 1985)、E・コリ trpE遺伝子に続いてマルチクローニング領域及び pUC 型のプラスミドのベクター配列が存在する。) を Eco RI を用いる消化によって線状化した。2 個の Eco RI 断片を連結し、そ

してE・コリRR1株に形質転換した。形質転換体から調製されたプラスミドDNAを制限酵素分析によりスクリーニングし、そして適当な方向にBAR1断片を含有するクローンをpSW242と命名した。

プラスミドpSW242を有するE・コリRR1の形質転換体コロニーを4 mlのM9+CA+amp+W(第2表)に接触し、そして37℃にて一夜増殖せしめた。一夜培養物を30 mlのM9+CA+amp+W(第2表)中に1:10で希釈し、そして激しく通気しながら30℃にて1時間増殖せしめた。1時間後、この培養物に100%エタノール中10 mg/mlのインドールアクリル酸(シグマ、セントルイス、Mo) 150 µlを加え、そしてこれを30℃にてさらに2時間培養した。

第3表

2×サンプル緩衝液

3.6 ml	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
1.6 ml	グリセロール
1.6 ml	2.0 % SDS
4 ml	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 中 0.5 %

1 lの最終容量に希釈した。300 mlのこの溶液にゼラチンを添加し、そしてゼラチンが溶液に溶解するまでマイクロウェーブオーブン中で加熱した。ゼラチン溶液を最初の溶液の残りに添加し、そして4℃にて冷却するまで攪拌した。緩衝液を4℃に貯蔵した。

培養物を遠心によりペレット化し、そして上清を廃棄した。この細胞ペレットを50 µlのクラッキング緩衝液(第3表)に再懸濁し、そして37℃にて0.5~3時間インキュベートした。等容量の2×サンプル緩衝液(第3表)を加え、そしてそしてこのサンプルを沸騰水浴中で3~5分間加熱した。サンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。タンパク質を、Towbin等(前掲)により本質的に記載されている方法を用いてニトロセルロースに移行せしめた。ニトロセルロースフィルターを、100 mlの蒸留水、4 mlの水酢酸及び4滴のシリング(Schilling)グリーン食品着色剤(McCormick and Co. Inc., パルチマ、Md.)の溶液に浸漬することにより染色した。

ブロモフェノールブルー

すべての成分を混合する。使用の直前に、100 µlのβ-メルカプトエタノールを900 µlずつの色素混合物に加える。

クラッキング緩衝液

0.01 M	リン酸ナトリウム、pH 7.2
1 %	β-メルカプトエタノール
1 %	ドデシル硫酸ナトリウム
6 M	尿素

ウエスタン移行緩衝液

2.5 mM	Tris, pH 8.3
1.9 mM	グリシン、pH 8.3
2.0 %	メタノール

ウエスタン緩衝液

5.0 ml	1 M Tris, pH 7.4
2.0 ml	0.25 M EDTA, pH 7.0
5 ml	1.0 % NP-40
37.5 ml	4 M NaCl
2.5 g	ゼラチン

Tris, EDTA, NP-40及びNaClは蒸留水により

バリアータンパク質に相当するバンドをフィルターから切り取り、そして蒸留水で洗浄することにより染色を除去した。バリアータンパク質を含有する脱染色したニトロセルロースフィルターを37℃にて1時間乾燥し、そして次にフロインドのアジュバント(ICN Biochemicals, Costa Mesa, カリフォルニア)及びジメチルスルホキシド(DMSO)と混合した。この混合物をニュージーランド・ホワイトラビットに3ヶ所で皮下注射した。注射を、最初の注射の後2.5ヶ月反復した。最終注射の10日後、ラビットから全血を取り出し、そして凝固せしめた。血液凝固物を遠心により血清から分離した。血清を新しいチューブに取り、そして-20℃にて貯蔵した。C-2465と称するこれらのポリクローナル抗体はバリアータンパク質を認識した。

C. 温度により調節されるMNN9株におけるBAR1の発現

S. セレビスエーXC42-288株を温度調節MNN9発現ベクターpSW24(例3)及びpZY66(例5)又は

pSW24 及び pM111 により、例えば Beggs (前掲) の文献において知られている方法を用いて形質転換した。形質転換体を、25℃にて-Leu-TrpDS (第2表) 上で増殖するそれらの能力について選択した。

形質転換体を、単一コロニーを得るために-Leu-TrpSプレート上でストリークし、そして25℃、30℃又は35℃にて増殖せしめた。形質転換体コロニーを5mlの-Leu-TrpDS中に接種し、そして、接種の増殖温度に依存して25℃、30℃又は35℃にて一夜増殖せしめた。この一夜培養物を50mlの-Leu-TrpDS中に1:100で希釈し、そして25℃、30℃又は35℃にて約48時間増殖せしめた。

遠心により細胞を培養物から除去し、そして上清をデカントし、そして貯蔵した。-20℃に維持された95%アルコール等容量を各上清に加え、そしてこの混合物を-20℃にて45分間保持した。エタノール混合物をGSA (ソルバル) ローター中で90000rpmにて30分間4℃で回転させて

沈澱をペレット化した。上清をデカントし、そしてペレットを乾燥した。このペレットを500μlの蒸留水に再懸濁した。

50μlの2×サンプル緩衝液 (第3表) を50μlの各再懸濁サンプルに加え、そしてこの混合物を10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、そしてTowbin等 (前掲) により本質的に記載されている方法を用いてニトロセルロースに移した。ニトロセルロースフィルターをラビット・ポリクローナルC-2465によりブローブし、そして西洋ワサビ・パーオキシダーゼ接合ヤギ抗ラビット抗体を用いて可視化した。イムノプロットが示すところによれば、35℃において、XCY42-28B (pSW24, pZY66) により作られるバリアー物質Pタンパク質は、すべての温度において増殖したXCY42-28B (pW42, pM11) と同じ量のグリコシル化を有する均一な種として存在する。これは、35℃においてMNN9遺伝子はターンオフされ、そしてタンパク質のグリコシル化は、同様に形質転換されたmnn9株において見出されるように行われ

ることを示した。30℃において、XCY42-28B (pSW24, pZY66) により生産されるバリアー物質Pタンパク質はほとんど超グリコシル化され、そして25℃において、XCY42-28B (pSW24, pZY66) から生産されるバリアー物質Pタンパク質は非常に不均一な超グリコシル化種であった。

例7. mnn1変異体の検出法

mnn9株から生産されたバリアータンパク質に対してラビットポリクローナル抗体を生じさせた。IPI1プロモーター、MFα1シグナル配列及びBAR1コード配列を含んで成るpZV100により形質転換されたXV732-1-9A (例1.A.) からバリアータンパク質を製造した。プラスミドpZV100は次の様にして作製した。

IPI1プロモーターをプラスミドpM210 (pM220としても知られており、ATCC No. 39854として寄託されている。プラスミドpM210をBgl II及びHind IIIで消化して0.47kb断片 (断片1) を単離した。

MFα1シグナルペプチドをコードするHind III-Eco RIアダプターを、仮のBAR1シグナル配列が欠

失したBAR1遺伝子の5'-コード配列の部分と共にクローニングベクターpUC13にサブクローニングした。プラスミドpZV16 (例3) をEco RI及びSal Iにより消化して0.67kb BAR1断片を単離した。オリゴヌクレオチドZC566 (5'-AGC TTT AAC AAA CGA TGG CAC TGG TCA CTT AG-3')、及びZC567 (5'-AAT TCT AAG TGA CCA GTG CCA TCG TTT GTT AA-3') をManiatis等 (前掲) に記載されているようにしてキナーゼ処理し、そしてアニールした。キナーゼ処理しそしてアニールしたZC566/ZC567 アダプターを、Hind III及びSal Iによる消化によって線状化されたpUC13と共に、三部分連結により0.67kb BAR1断片と連結した。生ずる連結混合物を用いてE・コリJM83株を形質転換した。得られた形質転換体から調製されたプラスミドDNAをHind III及びSal Iを用いる消化によってスクリーニングした。陽性クローンをプラスミドpZV96と命名した。プラスミドpZV96をHind III及びSal Iにより消化して、ZV566/ZC567アダプター-BAR1断片を含む0.67kb断片 (断片2)

を単離した。

BAR1遺伝子の残りをpZV9 (例3) から誘導した。プラスミドpZV9をSal I及びBam HIで消化して1.25kbのBAR1断片 (断片3) を単離した。断片1及び2 (それぞれTP11プロモーター-MF α 1シグナル配列及びZC566/ZC567-BAR1断片を含む) を断片3 (1.25kb BAR1断片) 及びBam HIにより消化して線状化されたYEpl3に連結した。生ずる連結混合物をE・コリRR1に形質転換した。得られた形質転換体から調製されたプラスミドDNAをBam HI+Hind III、及びBam HI+Sal Iにより消化して構成を確認し、そして挿入の方向を決定した。YEpl3ベクター上のHind III部位の近くにTP11プロモーターを有する陽性クローンをpZV100と命名した。

S. セレビスイエー XV732-1-9AをpZV100により形質転換し、そして形質転換体を-LeuDSプレート (第2表) 上で増殖するそれらの能力について選択した。形質転換体コロニーを10mlの-LeuDS (第2表) 中に接種し、そして30℃に

て一夜増殖せしめた。一夜培養物を978mlの-LeuDS中に1:100に希釈し、そして培養物を30℃にて43時間増殖せしめた。培養物を遠心し、そして上清を250ml遠心管にデカントした。-20℃に維持された同容量の95%エタノールを添加し、そして混合物を-20℃にて約2時間インキュベートした。混合物をGSA (ソルバル) ローター中で9,000rpm、4℃にて30分間遠心した。上清を廃棄し、そしてタンパク質ペレットを空気乾燥した。このペレットを、合計6mlの1×サンプル緩衝液 (3mlの蒸留水及び3mlの2×サンプル緩衝液 (第2表)) 中に再懸濁した。

サンプルを10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、そしてTowbin等 (前掲) により記載された方法を用いてニトロセルロースに移した。このニトロセルロースフィルターを、100mlの蒸留水、4mlの無水酢酸、及び4滴のシリンググリーン食品着色料の溶液中に浸漬することにより染色した。バリアータンパク質に相当するバンドをフィルターから切り取り、そして蒸留水洗浄によ

り染色を除去した。脱洗色されたニトロセルロースバリアーバンドを37℃にて1時間乾燥し、そして次にフロインドのアジュバント (ICN Biochemicals, Costa Mesa, カリフォルニア) 及びジメチルスルホキシド (DMSO) と混合した。この混合物をニュージーランドホワイトラビットに3ヶ所で皮下注射した。約1ヶ月間融で3回注射を反復した。最終注射の10日後、ラビットから全血を採取し、そして凝固せしめた。遠心により血液凝固物を血清から分離した。血清を新しいチューブに取り出し、そして-20℃にて貯蔵した。これらのポリクローナル抗体はバリアータンパク質及び該タンパク質上に存在する糖成分を認識した。

試験株のコロニーをYEPDS上に増殖せしめ、そして生成したコロニーをニトロセルロースフィルター上にプレートした。このフィルターをウエスタン移行緩衝液 (第3表) 中での3回の15分間洗浄にかけた。フィルターを新鮮なウエスタン緩衝液Aに移し、そして1時間インキュベートした。次に、フィルターをウエスタン緩衝液Aにより5

分間洗浄した。ラビット・ポリクローナル抗バリアー (mnn9) 抗体の1:500希釈物をフィルターに加え、そして1時間以上インキュベートした。ウエスタン緩衝液A中で15分間ずつ3回洗浄することにより過剰の抗体を除去した。ヤギ抗ラビット西洋ワサビペーオキシダーゼー接合抗体の1:1000希釈物をフィルターに加え、そしてこれを1時間以上インキュベートした。蒸留水ですすぎ、次にウエスタン緩衝液B (第3表) により10分間ずつ3回洗浄しそして最終的に蒸留水ですすぐことにより、過剰の接合抗体を除去した。西洋ワサビ基質 (バイオラド、リッチモンド、カリフォルニア) の添加により、十分に発色するまで発色せしめた。抗体により淡く発色したコロニーがmnn1コロニーであった。

例8. mnn1株及びmnn1 mnn9株の作製

mnn1変異を有するS. セレビスイエー株、及びmnn1 mnn9変異を有するS. セレビスイエー株を次の様にして作製した。ZY400 (第1表) をLB1-220 (第1表、Yeast Genetic Stock Center, バーク

レー、カリホルニア) とクロスさせ、そして二倍体を選択し、そして XV803 と命名した。XV803 二倍体細胞を孢子形成せしめ、そして子のうを切開した。mnn1スクリーニング法を用いてmnn1変異の存在について孢子をスクリーニングした。YEPD 上での孢子の増殖により $\Delta mnn9::URA3$ マーカーをスコアした (mnn9変異体は浸透圧支持がない培地上であまり増殖しない)。遺伝子型が MAT α leu2-3, 112 $\Delta mnn9::URA3$ mnn1 である孢子を XV803-1B と命名した。遺伝子型が MAT α leu2-2, 112 mnn1 $\Delta pep4::CAT$ である他の孢子を XV803-16C と命名した。

例 9. mnn1 mnn9株における BAR1 の発現

BAR1 遺伝子の発現を mnn1 mnn9 株において試験した。XV803-1B 株、XV803-16C 株、XY100 株及び ZY400 株を pSW24 により形質転換した。形質転換体を、-LeuDS プレート (第 2 表) 上で増殖するそれらの能力について選択した。単一コロニーを得るために、形質転換体コロニーを新鮮な -LeuDS プレート上にストリークし、そして 30

℃にて増殖せしめた。形質転換体コロニーを 50 ml の -LeuDS (第 2 表) に接種し、そして 30℃にて約 48 時間増殖せしめた。培養物を取得し、細胞を遠心により培養媒体から除去した。上清を GSAビンにデカントし、そして -20℃に保持された等容量の 95% エタノールを添加した。混合物を -20℃にてインキュベートし、次に GSAローター中で 9000rpm で 4℃にて 30 分間遠心した。上清を廃棄し、そして沈澱を空気乾燥した。沈澱を 4 ml の蒸留水に再懸濁し、4 ml の冷 95% エタノールの添加により再沈澱せしめた。混合物をインキュベートし、そして上記の様に遠心した。上清を廃棄し、そしてペレットを空気乾燥した。

タンパク質の沈澱を 150 μ l の蒸留水に再懸濁した。サンプルを 150 μ l の 2 \times サンプル緩衝液 (第 3 表) で希釈し、次に 100 μ l の各サンプルを 10% ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。タンパク質を Towbin 等 (前掲) の方法によりニトロセルロースに移行せしめ、そして例 3 に記載し

たように物質 P 抗体を用いてバリアー蛋白質を可視可した。この結果が示すところによれば、mnn1 mnn9 二重変異体から作られたバリアータンパク質は mnn9 変異体又は mnn1 変異体から作られたタンパク質に比べて速く移動し、二重変異体から作られたバリアータンパク質は mnn9 変異体から作られたタンパク質に比べて少ない糖成分を含有するであろう。

例 10. MNN1 遺伝子のクローニング

上記の抗体スクリーニング法を用いて MNN1 遺伝子をクローニングする。ベクター YEp13 (Nasmyth 及び Reed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2119-2123, 1980) 中にクローン化された全酵母 DNA 断片のランダム混合物を含有するプラスミドのライブラリーを XV803-16C 株に形質転換し、そして形質転換体を -LeuDS プレート (第 2 表) 上で増殖するそれらの能力について選択する。形質転換体を、Hackay (前掲、1983) の方法により、-LeuD (第 2 表) に再懸濁し、そして計数する。ブールを希釈し、そして約 1200 細胞/プレート

(細胞がすべて生存しているとすれば) の密度で -LeuD プレート (第 2 表) 上にプレートする。このプレートを、コロニーが増殖するまで 30℃にてインキュベートする。コロニーをニトロセルロースフィルターにレプリカし、そして例 7 に記載した測定法によりスクリーニングする。ラビットポリクローナル抗体により暗い染色を示すコロニーは、mnn1 変異を補完しそして宿主が野生型グリコシル化タンパク質を生産することを可能にするプラスミドを含有するであろう。プラスミド DNA は、文献 (例えば、Hartig 等、前掲) において知られている方法により陽性クローンから単離され、そして E・コリ形質転換体に形質転換される。プラスミド DNA は E・コリ形質転換体から単離され、そして制限酵素分析にかけられる。

以上、本発明を例により具体的に記載したが、本発明の本質を逸脱することなく、種々の変異を行うことができよう。

4. 図面の簡単な説明

第 1 A 図および第 1 B 図は、それぞれ mnn9 およ

び *mn1* *mn9* 変異株の産生するサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 変性コオリゴ糖の構造を図示したものである。なお、第1A図は、*mn9* 変異株によって産生されるオリゴ糖の13個のマンノースの形態を図示し、第1B図は、*mn1* *mn9* 変異株の産生するオリゴ糖の10個のマンノースの形態を図示するものである。また、オリゴ糖の9個のマンノースの形態も示されている。図式中で、(M) はマンノースを示し、(GlcNAc) はN-アセチルグルコサミンを示し、(Asn) は Asn-X-Ser または Asn-X-Thr 受容体部位のアスパラギン残基を示し、(6) はマンノース間の1→6結合を示し、(3) はマンノース間の1→3結合を示し、そして(4) はマンノースとGlcNAc間の1→4結合を示す。

第2図は、pM111の構築を図示する。

第3図は、pY37、pZY48 およびpZY63の構築を図示する。

第4図は、MNN9遺伝子の核酸配列およびそれから誘導される一次翻訳生成物のアミノ酸配列を図

示するものであり、列の上の数字は核酸配列の参照のためのものであり、マイナスの数字は5'非コード配列を示す。

第5図は、pSH24の構築を図示する。

第6図は、pSXR111の構築を図示する。

第7図は、pZY66の構築を図示するものである。

特許出願人

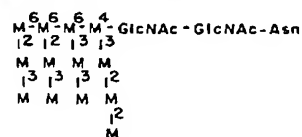
ザイモジェネティクス、
インコーポレイティド

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也

図面の浄書(内容に変更なし)

A. *mn9* オリゴサッカライド



B. *mn1* *mn9* オリゴサッカライド

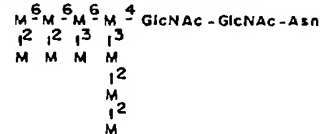


FIG.1

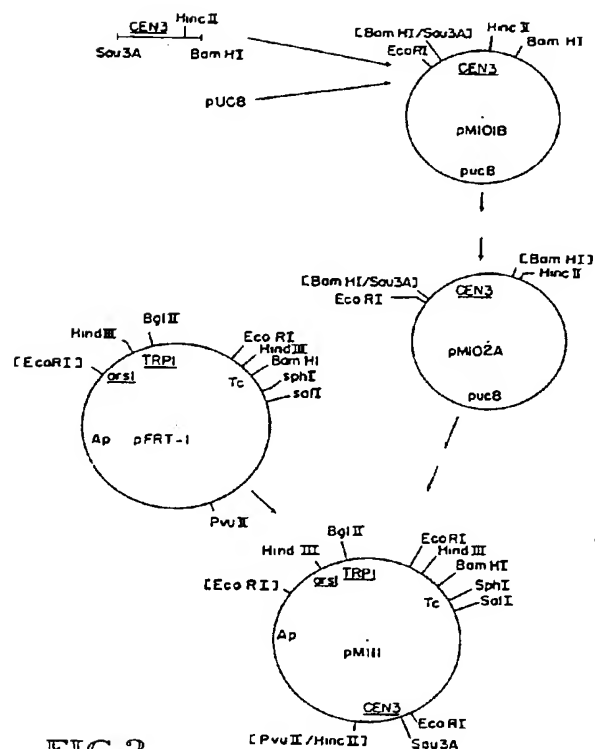


FIG.2

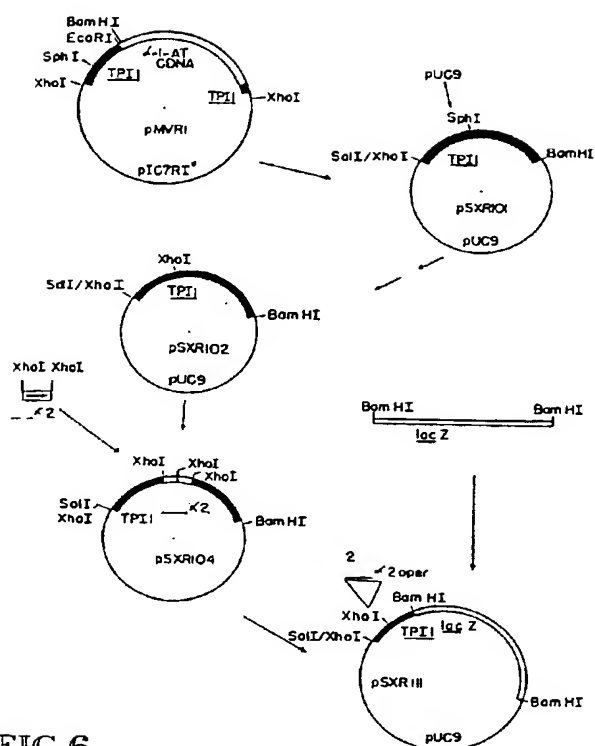


FIG. 6

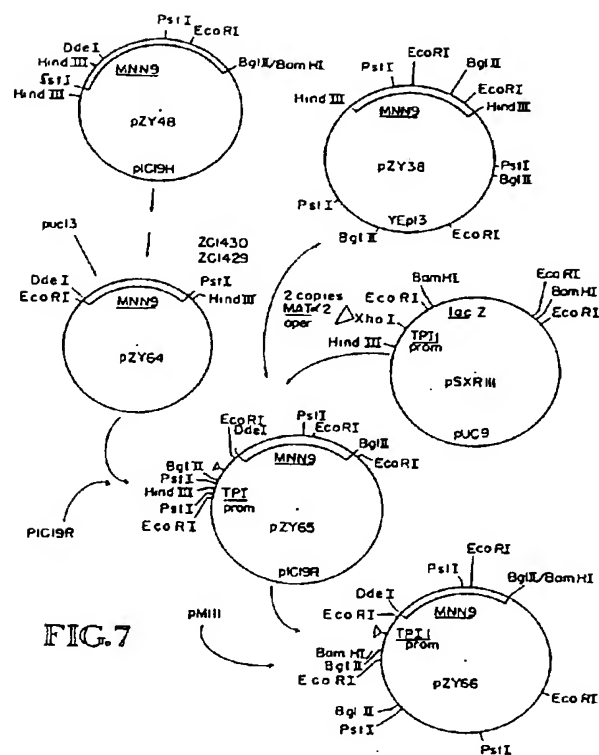


FIG. 7

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

// (C 12 N 1/16
C 12 R 1:865)
(C 12 N 15/54
C 12 R 1:865)

K

6712-4B

優先権主張

⑦1988年5月3日③米国(U S)③189547

②発明者

カルリ エル. イツブ

アメリカ合衆国, ワシントン 98007, ヘルプエ, ワンハ
ンドレッドフォーティーシックス アベニュー サウス
イースト 9

手続補正書(方式)

平成1年 4月 5日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第272004号

2. 発明の名称

タンパク質のグリコシル化の調節方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザイモジェネティクス,
インコーポレイティド

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(8579) 青木 朗

(外4名)



5. 補正命令の日付

平成1年3月7日(発送日)



6. 補正の対象

- (1) 願書の「出願人の代表者」の欄
- (2) 委任状
- (3) 明細書
- (4) 図面

7. 補正の内容

- (1)(2) 別紙の通り
- (3) 明細書の浄書(内容に変更なし)
- (4) 図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

- (1) 訂正願書 1通
- (2) 委任状及び訳文 各1通
- (3) 浄書明細書 1通
- (4) 浄書図面 1通